

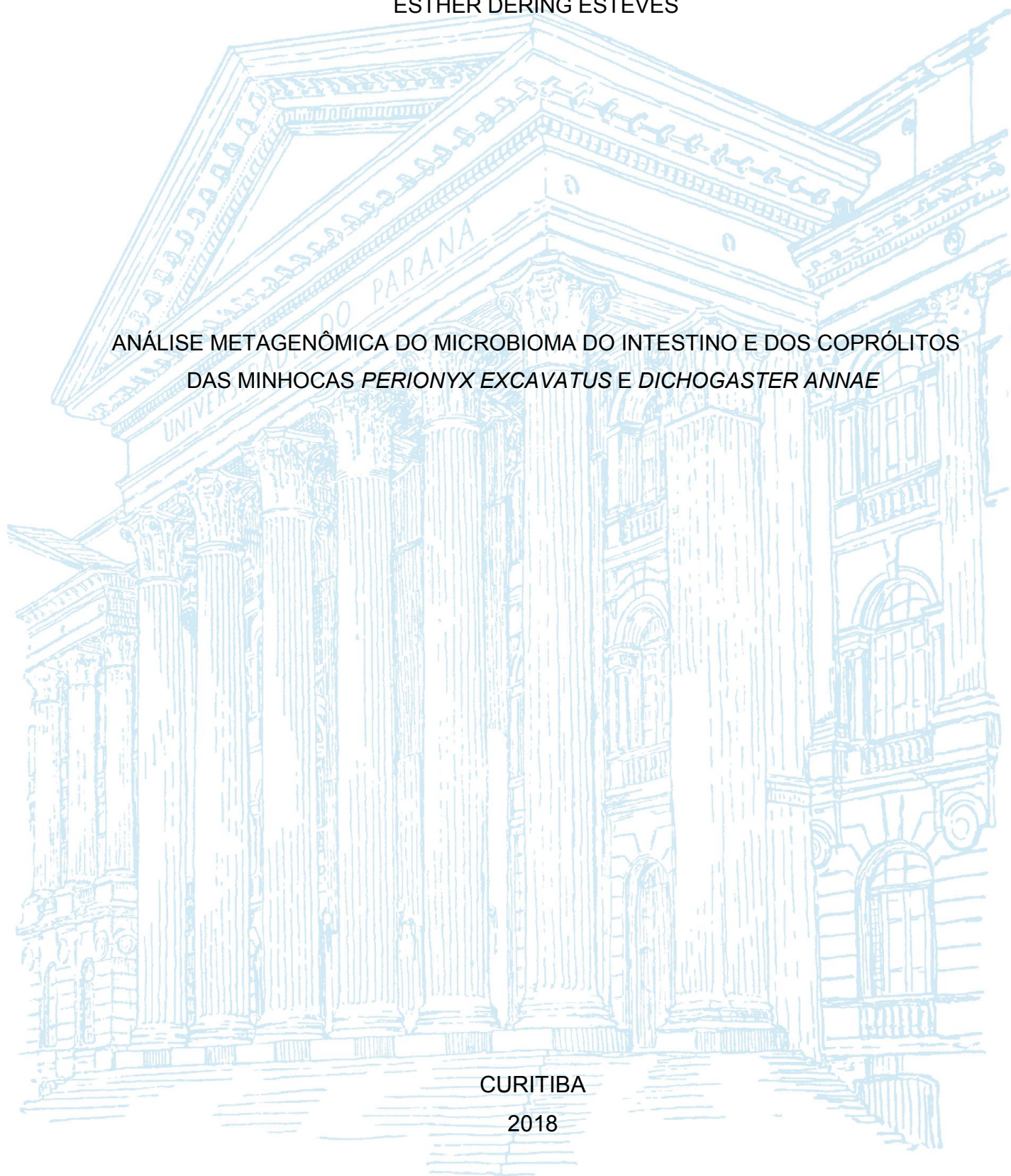
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ESTHER DERING ESTEVES

ANÁLISE METAGENÔMICA DO MICROBIOMA DO INTESTINO E DOS COPRÓLITOS  
DAS MINHOCAS *PERIONYX EXCAVATUS* E *DICHOGASTER ANNAE*

CURITIBA

2018



ESTHER DERING ESTEVES

ANÁLISE METAGENÔMICA DO MICROBIOMA DO INTESTINO E DOS  
COPRÓLITOS DAS MINHOCAS *PERIONYX EXCAVATUS* E *DICHOGASTER*  
*ANNAE*

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutor em Ciências –  
Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leda S. Chubatsu  
Coorientador: Dr. George G. Brown

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Esteves, Esther Dering

Análise metagenômica do microbioma do intestino e dos coprólitos das minhocas *Perionyx excavatus* e *Dichogaster annae*. / Esther Dering Esteves. – Curitiba, 2018.

130 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Leda S. Chubatsu

Co-orientador: George G. Brown

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Metagenoma. 2. Microbiota. 3. Minhoca. Título. II. Chubatsu, Leda S. III. Brown, George G. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.87328



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
(BIOQUÍMICA)

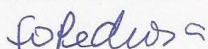
### TERMO DE APROVAÇÃO

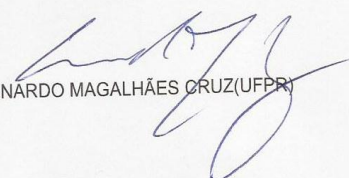
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **ESTHER DERING ESTEVES**, intitulada: **ANÁLISE METAGENÔMICA DO MICROBIOMA DO INTESTINO E DOS COPRÓLITOS DAS MINHOCAS PERIONYX EXCAVATUS E DICHOGASTER ANNAE**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de Doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de Fevereiro de 2018.

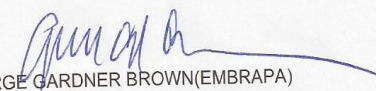
  
LEDA SATIE CHUBATSU(UFPR)  
(Presidente da Banca Examinadora)

  
FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA(UFPR)

  
LEONARDO MAGALHÃES CRUZ(UFPR)

  
RAFAEL MAZER ETTO(UEPG)

  
ROBERTO TADEU RAITTZ(UFPR)

  
GEORGE GARDNER BROWN(EMBRAPA)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Dr.<sup>a</sup> Leda S. Chubatsu e Dr. George Brown pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela orientação e pela amizade. Obrigada por todos os ensinamentos passados, por toda a paciência, pelo auxílio em todas as reuniões e todas as conversas paralelas pelos corredores que foram essenciais não somente para esta tese, mas também para a minha formação científica.

Agradeço a Dr.<sup>a</sup> Leda S. Chubatsu pela confiança e apoio, acreditando que eu seria capaz de realizar as etapas do projeto. Obrigada pelo apoio durante minhas dificuldades na vida pessoal e por todas as conversas sobre filmes, séries e livros. Obrigada por ter sido minha mãe científica.

Agradeço ao Dr.<sup>o</sup> George Brown pela oportunidade da viagem ao exterior e assim pude conhecer o grupo de pesquisa da Alemanha. Pelas indicações de congressos e pelas confraternizações na sua casa, em todos estes lugares tive a chance de conhecer as pessoas dos artigos que eu lia.

Agradeço aos professores Dr.<sup>o</sup> Fábio de Oliveira Pedrosa e Dr.<sup>o</sup> Leonardo M. Cruz pelas correções dos relatórios e da primeira versão da tese, todas as sugestões contribuíram para o enriquecimento e desenvolvimento do trabalho.

Agradeço aos demais professores do grupo pelas discussões e contribuições durante as reuniões, as quais foram de suma importância. Agradeço aos técnicos Roseli Prado e Valter pela amizade, atenção, auxílio e carinho em todos os momentos.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica que permitiram a realização deste trabalho.

A todas as Instituições Financiadoras, particularmente ao INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio pelo apoio financeiro e a CAPES pela bolsa de estudos.

Agradeço ao Eduardo Balsanelli pelo sequenciamento do gene 16S DNAr e também por todo profissionalismo e paciência no auxílio de algumas dúvidas. Agradeço a Thalita, Vânia e Michelle pelo sequenciamento do metagenoma e metatranscriptoma. Agradeço em especial a Thalita pela paciência, apoio e as conversas nos corredores que me ajudaram a entender melhor algumas etapas do projeto.

Agradeço ao Denny que me ajudou nos primeiros passos da bioinformática quando me ajudou a entender o que significava as linhas de comando do pipeline de análise de biodiversidade e então pude começar a explorar sozinha esse novo mundo de



pesquisa. Agradeço ao Rodrigo e Helba por toda ajuda na parte de bioinformática, me ajudando a entender essa área de pesquisa e também na ajuda de elaboração de script. Agradeço a Rafa pelas dicas no uso do excel.

Agradeço a todos os colegas do núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio. Obrigada por toda a ajuda no dia a dia do laboratório e também pela amizade e boas risadas.

Agradeço todo o incentivo e amor da minha família, ao meu pai Leci e minha mãe Regina que sempre me incentivaram nos estudos, ao meu irmãozinho Felipe e ao meu irmão Vitor.

Um agradecimento especial a Deus por me conceder esta oportunidade e me fortalecer, além de colocar pessoas especiais ao meu lado para me apoiarem e ajudarem.

“Porque Dele, e por meio Dele, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém.!”

Romanos 11:36

## RESUMO

A contribuição das minhocas no processo de decomposição da matéria orgânica tem ganhado relevância devido à busca de um melhor gerenciamento dos resíduos orgânicos. As alterações na composição das comunidades microbianas durante o trânsito do solo e da matéria orgânica pelo intestino desempenham um papel importante no processo de decomposição. Assim, a identificação dos microrganismos presentes nas diferentes porções do intestino e do coprólito das espécies de minhoca *Perionyx excavatus* e *Dichogaster annae* poderá contribuir para um melhor entendimento da importância funcional da comunidade bacteriana entérica e excretada por ela. Além disso, permite a busca por grupos bacterianos que podem ter desenvolvido relação mutualística ou simbiótica com as minhocas.

A fim de descrever a comunidade bacteriana do conteúdo das três porções do intestino, do coprólito e do alimento ofertado às minhocas (substrato) adotou-se a abordagem de sequenciamento do gene 16S rRNA, utilizando a plataforma MiSeq Illumina. Os resultados indicam uma distinta separação da diversidade entre as comunidades bacterianas do substrato e aquelas das minhocas. As comunidades nas regiões anterior e média são similares entre si, enquanto a comunidade da região posterior é similar à do coprólito. Os filos Proteobacteria e Bacteroidetes são mais abundantes no substrato, sendo suas quantidades diminuídas durante a passagem nas regiões anterior e média do intestino e voltando a aumentar na região posterior. No entanto, a composição das classes no substrato e na região posterior é diferente, havendo prevalência da classe Gammaproteobacteria na região posterior. Os filos TM6, Planctomycetes e Chlamydiae foram mais abundantes nas comunidades intestinais das minhocas, principalmente nas regiões anterior e média. O táxon TM6 foi encontrado estritamente no intestino de minhoca.

Para explorar o potencial funcional da comunidade bacteriana do intestino dessas espécies de minhoca foram empregadas duas abordagens de sequenciamento total: o DNA total (metagenoma) e o RNA (metatranscriptoma). Ambos os sequenciamentos foram realizados utilizando a plataforma Ion Torrent. Toda a região do intestino possui potencial para a digestão da matéria orgânica embora os dados indiquem diferentes níveis de digestão nas diferentes regiões. Os dados do metatranscriptoma mostraram genes transcritos para o metabolismo central como DNA, RNA, metabolismo de proteínas e energia. Além da transcrição dos genes para a fermentação pela via do succinato. Este trabalho destaca a utilidade da abordagem metagenômica para a investigação da microbiota do intestino de minhoca. No presente trabalho foi possível verificar que existe uma diferença entre a comunidade microbiana do intestino da minhoca e do que é ingerido por ela. A mudança na comunidade bacteriana foi diferente para cada espécie de minhoca. Existe evidência de uma microflora vinculada à minhoca. Além disso, foi possível verificar a grande versatilidade metabólica da região posterior do intestino das minhocas alvos do estudo para a fermentação da matéria orgânica, sendo que nas condições estudadas, a via do succinato está sendo transcrita.

Palavras Chaves: Metagenoma, Metatranscriptoma, Microbiota, Minhoca.



## ABSTRACT

Earthworms' contribution in processing organic matter decomposition has been raising its relevance due to the search for a better management of organic waste. Changes in microbial communities' composition during the transit of soil and/or organic matter through the earthworm gut play an important role in the decomposition process. Therefore it is important to identify which microorganisms are present in the different portions of earthworm gut and its cast in order to understand earthworm influence upon the soil bacterial community. In addition, it is possible to look for bacterial groups that may have developed a mutualistic or symbiotic relationship with earthworms. In this work we analyzed two epigeic earthworm species: *Perionyx excavatus* and *Dichogaster annae*. High throughput DNA sequencing approach was performed to assess the microbial communities of three portions of earthworm gut, their cast and the substrate used for their feeding. Bacterial biodiversity was accessed through the analyses of the 16S rRNA gene using the *Illumina MiSeq platform*. Results indicated distinct bacterial community between the substrate and those of the earthworms. Foregut and midgut showed higher similarity as well as the hindgut and cast. Phyla Proteobacteria and Bacteroidetes were more abundant in substrate whereas a decrease was observed through the foregut and midgut, increasing again within the hindgut. However, class composition was different between substrate and hindgut with a prevalence of Gammaproteobacteria in the hindgut. TM6, Planctomycetes and Chlamydiae phyla were more abundant in earthworm specimens, mainly in the foregut and midgut. The TM6 taxon was found only to the earthworm gut.

In order to explore the functional potential of the intestinal bacterial community of these earthworm species, two global DNA sequencing approaches were employed: total DNA (metagenome) and RNA (metatranscriptome). Both DNA sequencing were performed using the Ion Torrent platform. Results indicated that the earthworm gut has potential for digestion of organic matter although data indicate different levels of digestion in different gut regions. Metatranscriptome data showed transcribed genes for central metabolism such as DNA, RNA, protein metabolism and energy. This work highlights the utility of the metagenomic approach for the investigation of the earthworm gut microbiota. In the present work it was possible to verify that there is a difference between the microbial community of the earthworm gut and what is ingested by it. The change in bacterial community structure was different for each earthworm species. There is evidence of a microflora linked to earthworm. In addition, it was possible to verify the great metabolic versatility of hindgut of earthworms for fermentation of organic matter.

Key-words: Metagenome, Metatranscriptome, Microbiota, Earthworms.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 - MODELO DE COLETA DAS AMOSTRAS.....</b>	<b>35</b>
<b>FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DOS MÉTODOS DE ANÁLISE ÔMICA .....</b>	<b>42</b>
<b>FIGURA 3 - DNA TOTAL EXTRAÍDO POR DIFERENTES PROTOCOLOS.....</b>	<b>51</b>
<b>FIGURA 4 - AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE 16S rRNA.....</b>	<b>53</b>
<b>FIGURA 5 - ELETROFORESE DE DNA EXTRAÍDO PELO MÉTODO M7A DE AMOSTRAS DE INTESTINO E COPRÓLITO DE MINHOCAS DAS ESPÉCIES <i>P. EXCAVATUS</i> E <i>D. ANNAE</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>FIGURA 6 - ELETROFORESE DE DNA EXTRAÍDO PELO MÉTODO M7A DAS AMOSTRAS DE SUBSTRATO.....</b>	<b>57</b>
<b>FIGURA 7 - ELETROFORESE DE DNA EXTRAÍDO PELO MÉTODO M7B DAS AMOSTRAS DE INTESTINO DAS MINHOCAS DAS ESPÉCIES <i>P. EXCAVATUS</i> E <i>D. ANNAE</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>FIGURA 8 - CURVA DE RAREFAÇÃO DAS AMOSTRAS DE 16S rRNA.....</b>	<b>60</b>
<b>FIGURA 9 - COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SUBSTRATO, INTESTINO E COPRÓLITO AO NÍVEL DE FILO OBSERVADA PARA AS DUAS ESPÉCIES DE MINHOCA.....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURA 10 - COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SUBSTRATO, INTESTINO E COPRÓLITO DA MINHOCA <i>P. EXCAVATUS</i> AO NÍVEL DE CLASSE.....</b>	<b>62</b>
<b>FIGURA 11 - COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SUBSTRATO, INTESTINO E COPRÓLITO DA MINHOCA <i>D. ANNAE</i> AO NÍVEL DE CLASSE.....</b>	<b>62</b>
<b>FIGURA 12 - DIFERENÇAS NA ABUNDÂNCIA RELATIVA DE FILOS BACTERIANOS DAS COMUNIDADES DO SUBSTRATO E DAS AMOSTRAS PERTENCENTES A <i>P. EXCAVATUS</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>FIGURA 13 - DIFERENÇAS NA ABUNDÂNCIA RELATIVA DE FILOS BACTERIANOS DAS COMUNIDADES DO SUBSTRATO E DAS AMOSTRAS PERTENCENTES A <i>D. ANNAE</i>.....</b>	<b>66</b>
<b>FIGURA 14 - DIFERENÇAS NA ABUNDÂNCIA RELATIVA DAS CLASSES BACTERIANAS DAS MICROBIOTAS DO SUBSTRATO, DO CONTEÚDO INTESTINAL DAS MINHOCAS E DOS COPROLITOS.....</b>	<b>67</b>

<b>FIGURA 15 - HEATMAP INDICANDO A ABUNDÂNCIA RELATIVA PARA CADA FILO DE BACTERIA E ARQUEA EM CADA AMOSTRA.....</b>	<b>68</b>
<b>FIGURA 16 - NETWORK DE OTUS, EM NÍVEL DE GÊNERO, DAS COMUNIDADES BACTERIANAS.....</b>	<b>69</b>
<b>FIGURA 17 - NETWORK DE OTUS, EM NÍVEL DE GÊNERO, DAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE AMBAS AS ESPÉCIES DE MINHOCAS.....</b>	<b>69</b>
<b>FIGURA 18 - ANÁLISE DE COORDENADAS PRINCIPAIS (PCOA).....</b>	<b>70</b>
<b>FIGURA 19 - ATRIBUIÇÃO TAXONÔMICA DA AMOSTRA DAS REGIÕES ANTERIOR E MÉDIA DE <i>P. EXCAVATUS</i>.....</b>	<b>81</b>
<b>FIGURA 20 - ATRIBUIÇÃO TAXONÔMICA DA AMOSTRA DA REGIÃO POSTERIOR DE <i>P. EXCAVATUS</i>.....</b>	<b>81</b>
<b>FIGURA 21 - ATRIBUIÇÃO TAXONÔMICA DA AMOSTRA DA REGIÃO POSTERIOR DE <i>D. ANNAE</i>.....</b>	<b>82</b>
<b>FIGURA 22 - EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DAS AMOSTRAS DO INTESTINO DA MINHOCA <i>P. EXCAVATUS</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>FIGURA 23 - ANOTAÇÃO FUNCIONAL VIA COG CLASSIFICADA EM CATEGORIAS FUNCIONAIS.....</b>	<b>87</b>
<b>FIGURA 24 - ANOTAÇÃO FUNCIONAL VIA UNIPROT50 CLASSIFICADA EM CATEGORIAS FUNCIONAIS.....</b>	<b>87</b>
<b>FIGURA 25 - CLASSIFICAÇÃO DAS <i>ORFS</i> EM CATEGORIAS DO KEGG VIA KOALA.....</b>	<b>88</b>
<b>FIGURA 26 - CLASSIFICAÇÃO DAS <i>ORFS</i> EM CATEGORIAS DO KEGG VIA KAAS.....</b>	<b>89</b>
<b>FIGURA 27 - VIAS METABÓLICAS DAS AMOSTRAS DE <i>P. EXCAVATUS</i>.....</b>	<b>91</b>
<b>FIGURA 28 - VIAS METABÓLICAS DA AMOSTRA DE <i>D. ANNAE</i>.....</b>	<b>92</b>
<b>FIGURA 29 - VIAS METABÓLICAS DO INTESTINO DE <i>P. EXCAVATUS</i>.....</b>	<b>93</b>
<b>FIGURA 30 - GENES ANOTADOS PARA ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE CARBOIDRATO.....</b>	<b>96</b>
<b>FIGURA 31 - VIAS DE PRODUÇÃO DE METANO.....</b>	<b>100</b>
<b>FIGURA 32 - METABOLISMO DO NITROGÊNIO DAS REGIÕES ANTERIOR E MÉDIA DE <i>P. EXCAVATUS</i>.....</b>	<b>107</b>

<b>FIGURA 33 - METABOLISMO DO NITROGÊNIO DA REGIÃO POSTERIOR DE <i>P. EXCAVATUS</i>.....</b>	<b>107</b>
<b>FIGURA 34 - METABOLISMO DO NITROGÊNIO DA REGIÃO POSTERIOR DE <i>D. ANNAE</i>.....</b>	<b>108</b>
<b>FIGURA 35 - CICLO DO NITROGÊNIO EM <i>P. EXCAVATUS</i>.....</b>	<b>109</b>
<b>FIGURA 36 - METABOLISMO DO SULFATO DAS REGIÕES ANTERIOR, MÉDIA E POSTERIOR DE <i>P.EXCAVATUS</i>.....</b>	<b>110</b>
<b>FIGURA 37 - METABOLISMO DO SULFATO DA REGIÃO POSTERIOR DE <i>D. ANNAE</i>.....</b>	<b>110</b>
<b>FIGURA 38 - MODELO HIPOTÉTICO DAS ATIVIDADES ANAERÓBICAS NO INTESTINO DE <i>P. EXCAVATUS</i>.....</b>	<b>113</b>
<b>FIGURA 39 - MODELO HIPOTÉTICO DAS ATIVIDADES ANAERÓBICAS NO INTESTINO POSTERIOR DE <i>D. ANNAE</i>.....</b>	<b>113</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - MÉTODOS USADOS PARA A EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE INTESTINO E COPRÓLITO DE MINHOCAS.....	36
<b>TABELA 2</b> - MÉTODO 06 DE EXTRAÇÃO DE DNA DE INTESTINO E COPRÓLITO DE MINHOCAS APRESENTADO NESTE TRABALHO.....	36
<b>TABELA 3</b> - MÉTODO M7 PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE INTESTINO E COPRÓLITO DE MINHOCAS MODIFICADO DO PROTOCOLO DESCRITO POR GRIFFITHS E COLABORADORES (2000).....	37
<b>TABELA 4</b> – GRAUS/NÍVEIS DE QUALIDADE PHRED.....	44
<b>TABELA 5</b> - ORGANISMOS PADRÃO KEGG. REPRESENTANTES DO CONJUNTO PADRÃO DOS ORGANISMOS PROCARIOTOS E SEUS CÓDIGOS DE REFERÊNCIA. OS GENOMAS DOS ORGANISMOS APRESENTADOS NA TABELA CORRESPONDEM AO CONJUNTO USADO PELO SERVIDOR AUTOMÁTICO DO KEGG, O KAAS, PARA A ANOTAÇÃO.....	45
<b>TABELA 06</b> - ORGANISMOS ADICIONAIS KEGG. ORGANISMOS, E SEUS CÓDIGOS DE REFERÊNCIA, ADICIONADOS NO CONJUNTO DE GENOMAS PADRÃO USADO PARA A ANOTAÇÃO REALIZADA PELO SERVIDOR AUTOMÁTICO KASS.....	46
<b>TABELA 7</b> - EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS INTESTINAIS DE <i>P. EXCAVATUS</i> .....	50
<b>TABELA 8</b> - PARÂMETROS DE QUALIDADE DO DNA DAS AMOSTRAS DO SUBSTRATO E DOS INTESTINOS DE <i>P. EXCAVATUS</i> E <i>D. ANNAE</i> .....	52
<b>TABELA 09</b> - QUANTIFICAÇÃO QUBIT. EXTRAÇÃO REALIZADA PELO MÉTODO M7A PARA A ANÁLISE DE BIODIVERSIDADE ATRAVÉS DO GENE 16S RRNA.....	57
<b>TABELA 10</b> - QUANTIFICAÇÃO QUBIT. EXTRAÇÃO REALIZADA PELO MÉTODO M7B PARA SEQUENCIAMENTO GLOBAL E ANOTAÇÃO FUNCIONAL.....	58
<b>TABELA 11</b> - TOTAL DE SEQUÊNCIAS OBTIDAS A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO DE DNA PARA ANÁLISE DE BIODIVERSIDADE E OTU DAS AMOSTRAS.....	59

<b>TABELA 12</b> - SEQUÊNCIAS, <i>CONTIGS</i> E <i>ORFS</i> PREDITAS DO SEQUENCIAMENTO GLOBAL DAS AMOSTRAS DE <i>P. EXCAVATUS</i> E <i>D. ANNAE</i> .	83
<b>TABELA 13</b> - <i>ORFS</i> ANOTADAS DO SEQUENCIAMENTO GLOBAL DAS AMOSTRAS DE <i>P. EXCAVATUS</i> E <i>D. ANNAE</i> .	84
<b>TABELA 14</b> - SEQUÊNCIAS DO SEQUENCIAMENTO DO CDNA.	85
<b>TABELA 15</b> - <i>CONTIGS</i> , <i>ORFS</i> PREDITAS E ANOTADAS DO SEQUENCIAMENTO DO CDNA.	85
<b>TABELA 16</b> - MAPEAMENTO CONTRA AS <i>ORFS</i> METAGENOMA.	86
<b>TABELA 17</b> - TRANSPORTE DE CARBOIDRATO.	97
<b>TABELA 18</b> - ENZIMAS DA VIA GLICÓLITICA.	97
<b>TABELA 19</b> - ENZIMAS PARTICIPANTES DAS VIAS FERMENTATIVAS EM PROCARIOTOS.	98
<b>TABELA 20</b> - ENZIMAS DAS VIAS FERMENTATIVAS.	99
<b>TABELA 21</b> - METANOGÊNICOS PRESENTES NAS AMOSTRAS DO SUBSTRATO E DAS DUAS ESPÉCIES DE MINHOCAS.	101
<b>TABELA 22</b> - ENZIMAS DA VIA WOOD-LJUNGDAHL.	103
<b>TABELA 23</b> - VIA WOOD-LJUNGDAHL.	103
<b>TABELA 24</b> - ACETOGÊNICOS PRESENTES NAS AMOSTRAS DO SUBSTRATO E DAS DUAS ESPÉCIES DE MINHOCAS.	104
<b>TABELA 25</b> - BACTÉRIAS RELACIONADAS AO CICLO DO NITROGÊNIO PRESENTES NAS AMOSTRAS DO SUBSTRATO E DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DAS DUAS ESPÉCIES DE MINHOCAS.	106
<b>TABELA 26</b> - BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS DO SUBSTRATO E DAS DUAS ESPÉCIES DE MINHOCA.	111

## LISTA DE ABREVIATURAS

BAC - *bacterial artificial chromosome* ou cromossomo artificial bacteriano  
BIOM - *Genomics Standards Consortium Biological Observation Matrix*  
BRS - Bactérias redutoras de sulfato  
COG - *Clusters of Orthologous Groups*  
CTAB - *brometo de cetil trimetil amônio*  
DNA - ácido desoxiribonucleico  
dNTP - desoxirribonucleosídeos trifosfato  
EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* ou ácido etilenodiamino tetra-acético  
FTHFS - *formyl tetrahydrofolate synthetase* ou formil tetrahidrofolato sintetase  
HCL – ácido clorídrico  
KAAS - *Kegg Automatic Annotation Server*  
kb – quilo pares de bases  
KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*  
KOALA - *Kegg Orthology and Links Annotation*  
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*  
ORF – *open reading frame* ou sequência codificadora de proteína  
OTU - *operational taxonomic units* ou unidade operacional taxonômica  
pb – pares de bases  
PEPC – *phosphoenolpyruvate carboxylase* ou fosfoenolpiruvato carboxilase  
QIIME - *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*  
RNA – ácido ribonucleico  
RPKM – *leituras per kilobase of transcript per million mapped leituras*  
SDS - *dodecil sulfato de sódio*  
TAE – tampão contendo Tris, Acetato e EDTA  
TBE – tampão contendo Tris, ácido bórico e EDTA  
TRIS - tris(hidroximetil)-aminometano  
UniRef - *Uniprot (Universal Protein Resource) Reference Clusters*  
UV- ultravioleta



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Minhocas</b>	<b>19</b>
<b>2.1.1</b>	<i>Perionyx excavatus</i>	<b>22</b>
<b>2.1.2</b>	<i>Dichogaster annae</i>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Microrganismos envolvidos na degradação anaeróbica da matéria orgânica no intestino de minhoca</b>	<b>23</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Fermentação</b>	<b>24</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Bactérias acetogênicas</b>	<b>24</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Bactérias desnitrificantes</b>	<b>25</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Bactérias redutoras de sulfato</b>	<b>26</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Metanogênicos</b>	<b>28</b>
<b>2.3</b>	<b>Abordagem Metagenômica e Metatranscriptômica</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivos gerais</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Minhocas</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Coleta das amostras</b>	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>Extração do DNA total</b>	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Análise de qualidade do DNA</b>	<b>37</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Eletroforese de DNA</b>	<b>37</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Quantificação de DNA</b>	<b>38</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Amplificação de DNA por PCR</b>	<b>38</b>
<b>4.5</b>	<b>Construção das bibliotecas de metagenômicas e sequenciamento do DNA</b>	<b>39</b>
<b>4.6</b>	<b>Extração do RNA</b>	<b>40</b>
<b>4.7</b>	<b>Tratamento do RNA extraído com DNase</b>	<b>40</b>
<b>4.8</b>	<b>Eletroforese de RNA</b>	<b>41</b>
<b>4.9</b>	<b>Depleção de rRNA</b>	<b>41</b>
<b>4.10</b>	<b>Construção e sequenciamento das bibliotecas de cDNA</b>	<b>41</b>
<b>4.11</b>	<b>Processamento dos dados</b>	<b>41</b>

4.11.1	Metagenômica .....	42
4.11.1.1	Análise do gene 16S rRNA .....	42
4.11.1.2	Sequenciamento genômico global .....	43
4.11.2	Metatranscriptômica .....	46
5	RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	48
5.1	Avaliação de métodos de extração de DNA total .....	49
5.2	Análise de Biodiversidade por amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA .....	58
5.3	Sequenciamento genômico global e metatranscriptoma .....	79
5.3.1	Biodiversidade .....	80
5.3.2	Anotação funcional .....	83
6	CONCLUSÕES .....	116
7	REFERÊNCIAS .....	117

## 1 INTRODUÇÃO

As minhocas são importantes integrantes do ecossistema solo constituindo 60-90% de sua biomassa animal, além de serem organismos chave no processo de decomposição da matéria orgânica (LAVELLE *et al.*, 1997; SINHA *et al.*, 2002; AIRA; MONROY; DOMÍNGUEZ, 2006; FONTE; BARRIOS; SIX, 2010; AIRA; DOMÍNGUES, 2011; OWA *et al.*, 2013; GÓMEZ-BRANDÓN; DOMÍNGUEZ, 2014). Devido à habilidade de biogestão das minhocas, a prática da vermicompostagem tem se tornado atrativa para o gerenciamento dos resíduos produzidos pelas atividades industriais e agrícolas. A vermicompostagem é um processo dinâmico que envolve a associação de microrganismos, os quais desempenham papel central na decomposição bioquímica da matéria orgânica. As minhocas participam do processo realizando a fragmentação da matéria orgânica e deste modo aumentando a superfície de contato para o crescimento dos microrganismos. Além disso, as minhocas causam mudança na estrutura da comunidade microbiana do ambiente através da formação de seus coprólitos (SINHA *et al.*, 2002; AIRA; MONROY; DOMÍNGUEZ, 2006; AIRA; DOMÍNGUES, 2011; GÓMEZ-BRANDÓN; DOMÍNGUEZ, 2014). O material ingerido pela minhoca sofre influência do ambiente intestinal, alguns organismos morrem durante a passagem pelo intestino enquanto outros proliferam (IDOWU; EDEMA; ADEYI, 2005; BYZOV *et al.*, 2007; JAYASINGHE; PARKINSON, 2009; OWA *et al.*, 2013). Além disso, as taxas de decomposição da matéria orgânica aumentam na presença de coprólitos (AIRA; DOMÍNGUES, 2011).

O entendimento de como a minhoca modifica a população bacteriana ingerida por ela é importante, assim como a investigação da comunidade bacteriana associada ao intestino da minhoca. Contribuindo para uma melhor compreensão do impacto exercido pela minhoca na decomposição da matéria orgânica. Contudo, o conhecimento da diversidade microbiana dependente de técnicas tradicionais de cultivo é limitado. Um dos principais problemas é o estabelecimento de meios e condições de cultivo compatíveis com o ambiente natural dos microrganismos. Estima-se que 99% dos microrganismos não podem ser cultivados ou são desconhecidos (TORSVISK; OVREAS; THINGSTAD, 2002). Assim a metagenômica tem sido a abordagem mais utilizada para contornar as limitações das técnicas dependentes de cultivo (MANDAL; SAHA; DAS, 2015). A metagenômica permite o estudo direto do material genético das bactérias presentes no

ambiente (HANDELSMAN *et al.*, 1998), e esta estratégia tem revelado uma rica diversidade de organismos, além do potencial funcional da comunidade microbiana. O estudo do genoma permite a descoberta de novos genes e vias metabólicas, e proporciona o entendimento das relações existentes nos ciclos biogeoquímicos. Além disso, possibilita a prospecção de enzimas com potencial biotecnológico (HONGO; ONKUMA; KUDO, 2003; BROWN *et al.*, 2011; WEI-LIN WANG, *et al.*, 2015; AIRA *et al.*, 2016; JOVEL *et al.*, 2016).

Apesar de a metagenômica ser uma ferramenta com grande potencial de investigação ela possui limitações e a detecção dos genes num determinado genoma ou num conjunto de genomas (DNA originado de uma comunidade) não significa que estes genes estão sendo expressos num determinado ambiente. A metatranscriptômica é um conjunto de técnicas que permite o acesso direto ao mRNA presentes no ambiente. Esta estratégia é adotada para determinar quais genes estão sendo transcritos sob uma determinada condição (FRANZOSA *et al.*, 2014; MEN *et al.*, 2017). Deste modo, a metagenômica e a metatranscriptômica são boas abordagens para a investigação conjunta da diversidade e função da comunidade bacteriana em um ambiente. No presente trabalho visamos investigar a comunidade bacteriana presente no intestino das espécies *P. excavatus* e *D. annae* e seus coprólitos e também do material disponibilizado para a alimentação dos animais. A análise de biodiversidade bacteriana foi realizada através do sequenciamento do gene 16S rRNA e o potencial funcional da comunidade bacteriana dentro do intestino da minhoca através da análise do sequenciamento global do DNA e mRNA.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Minhocas

As minhocas são importantes organismos do solo pertencentes ao filo Annelida, Classe Clitellata, subclasse Oligochaeta (Ruppert; Fox; Barnes, 2005). As minhocas são consideradas engenheiras do ecossistema do solo por afetarem a disponibilidade de recursos para outros animais através de modificações ambientais físicas (LAVELLE *et al.*, 1997). Além disso, suas atividades contribuem com pedogênese, agregação e aeração do solo, formação do húmus e reciclagem do lixo (FONTE, BARRIOS, SIX, 2010; OWA *et al.*, 2013; SINHA *et al.*, 2002).

As minhocas representam uma parcela importante de invertebrados do solo, uma vez que são organismos chaves na decomposição da matéria orgânica, modificando a dinâmica de nutrientes, populações e atividades dos microrganismos do solo (FONTE, BARRIOS; SIX, 2010; OWA *et al.*, 2013; SINHA *et al.*, 2002).

O interesse nesses animais tem aumentado nos últimos anos devido a sua contribuição na reciclagem de matéria orgânica, uma vez que o acúmulo de resíduos tem aumentado devido o crescimento da população humana e de suas práticas industriais e agrícolas (MUNNOLI; SILVA; BHOSLE, 2010; SINHA *et al.*, 2002). As minhocas podem aumentar a biodegradação e a decomposição da matéria orgânica de 60 para 80% (SINHA *et al.*, 2002) num processo denominado de vermicompostagem.

Sinha e colaboradores (2009) compararam o sistema de vermicompostagem (1.000 minhocas) à compostagem convencional aeróbica sem minhocas, em duas composições de resíduos: 1) restos de alimentos, consistindo de alimento cozido e cru. 2) restos de jardinagem, consistindo em grama cortada. Na vermicompostagem foi observada degradação de 100% em 15 dias para os resíduos de comida e 30 dias para os resíduos de jardinagem, enquanto na compostagem aeróbica convencional, em 90 dias degradou-se apenas 35% de ambos os materiais. De acordo com Sinha e colaboradores (2002) em condições ótimas de temperatura (20-30°C) e umidade (60-70%), utilizando cerca de 5 Kg de minhocas (aproximadamente 10.000 indivíduos da espécie *Eisenia fetida*) pode-se processar uma tonelada de matéria orgânica em 30 dias, demonstrando o potencial do sistema de vermicompostagem no gerenciamento de resíduos orgânicos.

Devido à capacidade de biodigestão das minhocas o estudo dos mecanismos envolvidos no processo da degradação da matéria orgânica tornou-se atrativo. Assim, a vermicompostagem consiste de interações entre as minhocas e os microrganismos, sendo que a comunidade microbiana desempenharia o papel principal na decomposição da matéria orgânica. As minhocas participam do processo através da fragmentação dos resíduos, aumentando a superfície de contato para o crescimento dos microrganismos (AIRA, MONROY e DOMÍNGUEZ, 2006). Além disso, a decomposição da matéria orgânica também é afetada pelos processos associados ao intestino da minhoca e nos coprólitos, ou *castings* (GÓMEZ-BRANDÓN e DOMÍNGUEZ, 2014).

Foi descrito que a atividade de várias enzimas, como  $\beta$ -glucosidase e celulase, são aumentadas na presença de coprólitos de minhoca (AIRA e DOMÍNGUES, 2011). Porém os efeitos das minhocas sobre a decomposição da matéria orgânica dependem da espécie de minhoca, do tempo e do tipo da matéria orgânica. A diferença na composição da comunidade microbiana dos coprólitos tem sido apontada como principal explicação para a diferença nos resultados encontrados (AIRA, MONROY e DOMÍNGUEZ, 2006; AIRA e DOMÍNGUES, 2011; GÓMEZ-BRANDÓN e DOMÍNGUEZ, 2014). Nos coprólitos (por exemplo, de *Aporrectodea caliginosa*), pode haver supressão ou crescimento de algumas espécies de bactérias, corroborando com a ideia de que as minhocas são capazes de afetar a comunidade microbiana do ambiente (OLEYNIK E BYZOV, 2008).

A comunidade microbiana do solo também sofre modificação durante a passagem pelo intestino da minhoca: alguns microrganismos são eliminados enquanto outros proliferam, sendo que o maior impacto é sobre microflora de fungos (BYZOV *et al.*, 2007; OLEYNIK E BYZOV, 2008; OWA *et al.*, 2013). BYZOV e colaboradores (2007) observaram que algumas espécies de fungos que são abundantes na comunidade fungal edáfica, como *Penicillium*, *Gliocladium*, *Acremonium* não foram detectadas em coprólitos de minhocas, enquanto outras, como *Mycelia sterila* e *Mucor hiemalis*, aumentaram.

A modificação da microflora pode ser devido a diferentes respostas dos microrganismos sob a influência dos fluídos intestinais da minhoca. Foi proposto que o microambiente do intestino da minhoca seria um habitat ideal para bactérias produtoras de  $N_2O$  (HORN; SCHRAMM; DRAKE, 2003). Posteriormente, quatro espécies de bactérias aeróbicas facultativas produtoras de  $N_2O$  foram isoladas de *Aporrectodea caliginosa* (HORN *et al.*, 2005), que apoiaria essa hipótese.

A população microbiana sofre diferentes influências dependendo da região do intestino da minhoca. A porção anterior do intestino funciona como filtro, ou seja, eliminando algumas espécies de bactérias e fungos, enquanto que na região posterior do intestino os microrganismos sobreviventes teriam um lugar adequado para um rápido crescimento (IDOWU; EDEMA; ADEYI, 2005; BYZOV *et al.*, 2007; JAYASINGHE; PARKINSON, 2009; OWA *et al.*, 2013).

Apesar do impacto exercido pela minhoca sobre os microrganismos ingeridos é importante ressaltar que a microbiota da minhoca é também influenciada pelo recurso alimentar (substrato) ingerido por ela (THAKUIRA *et al.* 2010; AIRA *et al.*, 2015). Embora o tipo de recurso alimentar possa causar mudanças na comunidade microbiana do intestino, o grupo ecológico da minhoca parece ser mais importante que o recurso alimentar disponível na determinação da diversidade bacteriana associada a parede intestinal da minhoca (THAKUIRA *et al.* 2010).

As minhocas são divididas em três grupos ecológicos: epigêicas, anécicas e endogêicas. As epigêicas vivem na superfície do solo e alimentam-se dos estágios primários e intermediários da matéria orgânica em decomposição e os estágios de decomposição refletem o valor nutricional da matéria orgânica. As anécicas vivem em galerias permanentes e se alimentam dos estágios intermediários da matéria orgânica, também ingerindo quantidades importantes de solo. As endogêicas vivem em galerias dentro do solo e se alimentam tanto de matéria orgânica quanto solo mineral (BAROIS *et al.*, 1999). As minhocas de diferentes grupos ecológicos e diferentes espécies têm características próprias no desempenho dos processos de ingestão, digestão, assimilação de nutrientes e estrutura e atividade da comunidade microbiana (PEDERSEN e HENDRIKSEN, 1993; THAKUIRA *et al.* 2010; GÓMEZ-BRANDÓN *et al.*, 2011). Além disso, os efeitos da seleção imposta pela minhoca sobre os microrganismos poderiam causar interações de competitividade entre os microrganismos ingeridos e os simbioses (GÓMEZ-BRANDÓN *et al.*, 2011).

Outra área de grande interesse corresponde às enzimas envolvidas no processo de degradação da matéria orgânica. As bactérias presentes no intestino da minhoca poderiam ter um grande potencial econômico, dado que poderiam ser usadas para aplicações industriais. As minhocas são “biorreatores naturais” já que possuem enzimas digestoras, como lipases, celulasas, amilases e proteases que degradam biomoléculas complexas em componentes simples, permitindo uma rápida conversão bioquímica de macromoléculas



encontradas em diversos tipos de resíduos orgânicos (PRABHA *et al.*, 2007). Por outro lado, o intestino das minhocas também tem sido descrito como um sistema digestivo mutualístico, no qual as enzimas são secretadas tanto pela minhoca quanto pelos microrganismos ali presentes.

Estudos que comparam a origem e a atividade de enzimas glicolíticas presentes no conteúdo intestinal de algumas espécies de minhocas demonstraram que nem todas as espécies desenvolveram uma relação mutualística com a microbiota do intestino. Espécies como *Dichogaster terrae nigrae* e *Hyperiodrilus africanis* possuem um sistema completo de hidrólise de celulose, mas em outras espécies, como *Milsonia anomala* e *Hormogaster elisae*, a celulase é de origem da microbiota e a celobiase da minhoca (LATTAUD *et al.*, 1997a; LATTAUD *et al.*, 1997b; LATTAUD *et al.*, 1999). Já na espécie *Pontoscolex corethrurus*, a ausência de atividade de celulase e celobiase nas culturas de tecido intestinal indica que a degradação da celulose é dependente da microflora (ZHANG *et al.*, 1993).

As exoenzimas produzidas pelos microrganismos aumentam a degradação da matéria orgânica e a capacidade de assimilação de nutrientes pela minhoca (TRIGO; LAVELLE, 1993; DRAKE; HORN, 2007).

No âmbito da gestão de resíduos, algumas espécies de minhocas têm sido relatadas como grandes biodegradadoras e digestoras de lixo, e dentre essas espécies encontram-se a *Perionyx excavatus* (SINHA *et al.*, 2002) e *Dichogaster annae*

### **2.1.1 *Perionyx excavatus***

*P. excavatus* é uma minhoca comumente encontrada em uma grande área tropical da Ásia e que foi transportada para a Europa e América do Norte. É uma espécie epigêica que vive em matéria orgânica contendo alta umidade (EDWARDS; DOMINGUEZ; NEUHAUSER, 1998). O ciclo de vida e o potencial desta espécie para decompor resíduos orgânicos têm sido documentados por vários autores sendo que um dos principais focos é o aumento do conhecimento sobre a espécie a fim de melhorar sua produção e também executar um bom gerenciamento para a vermicompostagem (REINECKE; HALLAT, 1989; EDWARDS; DOMINGUEZ; NEUHAUSER, 1998; GIRADDI *et al.*, 2008).

### **2.1.2 *Dichogaster annae***

A *Dichogaster annae* é uma espécie original da África que foi introduzida acidentalmente no Brasil. Esta espécie epigêica é encontrada frequentemente em esterco em estado de pré-compostagem e tem sido relatada como adequada para vermicompostagem por ser uma minhoca detritívora e requerer um substrato rico em matéria orgânica (JAMES; GUIMARÃES, 2010; MUNNOLI; SILVA; BHOSLE, 2010). Uma possível vantagem da utilização da *D. annae* para vermicompostagem é que seus excrementos possuem uma granulação pequena em comparação com espécies maiores de minhocas, facilitando a incorporação no solo e acesso pelas raízes de plantas. Durante os meses de inverno ou dias frios, nos quais a temperatura fique abaixo de 15°C, as minhocas desta espécie se tornam menos profiláticas e a produção da vermicompostagem é diminuída (JAMES; GUIMARÃES, 2010).

## **2.2 Microrganismos envolvidos na degradação anaeróbica da matéria orgânica no intestino de minhoca**

O intestino da minhoca é um ambiente anóxico, com alto teor de água, pH próximo a neutro e com grande quantidade de compostos orgânicos, condições favoráveis ao crescimento de bactérias anaeróbicas (DRAKE, HORN, 2007). A digestão anaeróbica é um processo bioquímico que converte substâncias orgânicas complexas em compostos simples como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>) (DEZOTTI, 2008).

A digestão da matéria orgânica costuma ser dividida em quatro estágios: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Os dois primeiros estágios são realizados por grupos bacterianos considerados como fermentadores primários (TIKHOMIROV, 2016). A etapa hidrolítica tem a função de quebrar os grandes polímeros da matéria orgânica como carboidratos, lipídeos e proteínas em monômeros simples como açúcares, glicerol e aminoácidos. A etapa seguinte, acidogênese, irá usar os compostos hidrolisados como substratos, obtendo como produtos finais os ácidos orgânicos acetato, propionato, butirato e lactato, e etanol, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. A acetogênese cataboliza moléculas simples, produtos da acidogênese, produzindo dióxido de carbono, hidrogênio e ácido acético. A metanogênese é considerada a etapa final da mineralização da matéria orgânica; nela

ocorre formação de metano, dióxido de carbono e água. Em condições anóxicas, aeróbios facultativos e anaeróbios obrigatórios podem acoplar a mineralização da matéria orgânica com aceptores de elétrons alternativos como nitrato, sulfato e  $\text{Fe}^{3+}$  (SCHMIDT, 2016; TIKHOMIROV, 2016).

### 2.2.1 Fermentação

A fermentação é um processo bioquímico que ocorre na ausência de  $\text{O}_2$  com o objetivo de obter energia e conservá-la na forma de ATP (trifosfato de adenosina) (NELSON e COX, 2006). Durante a glicólise a D-glucose é degradada em piruvato, o qual é metabolizado em diferentes compostos de acordo com o tipo da fermentação. Existem vários tipos de fermentação que são classificadas de acordo com o substrato fermentado ou o produto originado. Entre estas, fermentação alcoólica, láctica, propiônica, butírica, acetogênica e outras (NELSON; COX, 2006; MADIGAN *et al.*, 2010). Cada grupo de organismos que realizam cada uma delas evoluiu com a capacidade de fermentar determinado produto; portanto muitos desses organismos são especialistas metabólicos tornando-os um grupo restrito (MADIGAN *et al.*, 2010).

### 2.2.2 Bactérias acetogênicas

Acetogênicas compõem um grupo de bactérias estritamente anaeróbicas capazes de reduzir  $\text{CO}_2$  a acetato usando a via Wood-Ljungdahl (MÜLLER, 2003). Estas bactérias podem oxidar vários compostos para reduzir o  $\text{CO}_2$ , como  $\text{H}_2$ , metanol, açúcares, aminoácidos e álcoois dependendo do organismo (MÜLLER, 2003; MADIGAN *et al.*, 2010).

A via Wood-Ljungdahl possui dois ramos lineares, o ramo Metil e o ramo carbonil. A piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR) catalisa a descarboxilação oxidativa de piruvato para formar acetil-CoA e  $\text{CO}_2$ , PFOR liga o metabolismo heterotrófico à via Wood-Ljungdahl. No ramo metil a primeira reação é a redução de  $\text{CO}_2$  em formato pela formato desidrogenase e, em seguida, o formato é ativado e ligado a tetrahydrofolato (aqui indicado como  $\text{H}_4\text{F}$ ), resultando em formil- $\text{H}_4\text{F}$ . O próximo passo é a conversão de formil- $\text{H}_4\text{F}$  a metenil- $\text{H}_4\text{F}$  pela ciclohidrolase. Em seguida, uma desidrogenase reduz a metenil- $\text{H}_4\text{F}$  a metileno- $\text{H}_4\text{F}$ , que é reduzido a metil- $\text{H}_4\text{F}$  por uma

redutase. O grupo metilo é então transferido para uma proteína contendo um cofator corrinóide e núcleos ferro enxofre. O grupo metilo é condensado com monóxido de carbono pela monóxido de carbono desidrogenase/acetil-CoA sintetase (CODH/ACS) formando acetil-CoA. O monóxido de carbono é derivado de CO<sub>2</sub> que foi reduzido pela atividade CODH/ACS; esta reação ocorre no ramo carbonila da via. O acetato é produzido a partir do acetil-CoA por ação da fosfotransacetilase e da acetato quinase (MÜLLER, 2003; RAGSDALE, 2008; RAGSDALE, PIERCE, 2008; MADIGAN *et al.*, 2010).

As bactérias acetogênicas não usam exclusivamente o CO<sub>2</sub> comoceptor de elétrons. Outros compostos como nitrato e tiosulfato também podem ser usados. As acetogênicas possuem várias estratégias para lidar com O<sub>2</sub> e podem ser encontradas em habitats que não são permanentemente anóxicos. A versatilidade metabólica e a tolerância ao O<sub>2</sub> destas bactérias permite rápida adaptação a mudanças nas condições ambientais.

Estas bactérias são consideradas de pouco significado para o metabolismo do intestino de minhoca (SCHMIDT, 2016). No entanto, a produção de acetato foi estimulada por H<sub>2</sub> no intestino da minhoca *Eudrilus eugeniae* (MBA, 1988) e o acetogênico *Clostridium glycolicum* aumentou no intestino de *E. eugeniae* e *Lumbricus terrestris* suplementado com glucose (WÜST, HORN, DRAKE., 2009; SCHULZ *et al.*, 2015), em condições artificiais.

### 2.2.3 Bactérias desnitrificadoras

Os microrganismos desnitrificantes são os responsáveis pela principal produção biológica de N<sub>2</sub> gasoso (MADIGAN *et al.*, 2010).

A enzima envolvida na primeira etapa da redução dissimilativa do nitrato é a nitrato redutase formando como produto o nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), em seguida NO<sub>2</sub><sup>-</sup> é reduzido a óxido nítrico (NO) pela nitrito redutase. O próximo passo é a formação do óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) pela óxido nítrico redutase e por fim o nitrogênio (N<sub>2</sub>) pela óxido nitroso redutase. Todas as enzimas dessa via são reprimidas na presença de O<sub>2</sub> e para que sejam plenamente expressas é necessária a presença de nitrato (MADIGAN *et al.*, 2010).

Alguns organismos são capazes de reduzir NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a amônia (NH<sub>3</sub>) por um processo dissimilativo; este processo é distinto do processo assimilativo apesar de ambos terem a

amônia como produto final (TIEDJE, 1988; MADIGAN *et al.*, 2010). Portanto, a regulação desses processos ocorre de modo diferente (TIEDJE, 1988).

As bactérias desnitrificadoras são anaeróbicos facultativos e tem se observado que são competidores efetivos por carbono em ambientes aeróbicos não recorrendo ao processo de desnitrificação. No entanto, espera-se um aumento desses organismos quando há disponibilidade de nitrato e oxigênio limitado (TIEDJE, 1988). A redução dissimilatória de nitrato em amônia é um processo realizado por anaeróbicos estritos (TIEDJE, 1988) e competem pelo substrato com as bactérias desnitrificantes, uma vez que ambos são heterotróficos, ocupam os ambientes anóxicos e usam nitrato como aceptor de elétrons (POULIN *et al.*, 2007). O que determinará qual processo prevalecerá, assim como a densidade de cada tipo de bactéria é a razão entre a disponibilidade de carbono e aceptores de elétrons. Quanto maior a razão carbono/aceptor de elétrons, maior será a porcentagem de nitrato usado pelas bactérias que reduzem o nitrato a amônia no processo dissimilatório (TIEDJE, 1988; HARDISON *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012).

#### **2.2.4 Bactérias redutoras de sulfato**

Bactérias redutoras de sulfato (BRS) utilizam formas oxidadas de enxofre, como aceptor final de elétrons, tendo como produto dessa reação o gás sulfídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Os compostos de enxofre que são usados como aceptores finais de elétrons são sulfitos ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), tiosulfatos ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) e sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), sendo este último o mais utilizado na redução dissimilatória de sulfato (MADIGAN *et al.*, 2010). Além dos compostos de enxofre, a redução de nitrato e nitrito tem sido relatada, principalmente, nos gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium* e *Desulfobulbus* (SILVA, 2014). As BRS utilizam diferentes compostos orgânicos como doadores de elétrons como lactato, acetato, propionato, álcoois monovalentes e hidrogênio (MADIGAN *et al.*, 2010).

As BRS realizam a redução do íon sulfato de forma dissimilativa. Tanto no processo dissimilativo quanto no assimilativo há a redução do íon sulfato, porém na redução assimilativa os íons sulfato são reduzidos a sulfeto e este é incorporado às moléculas orgânicas como os aminoácidos e coenzimas (MADIGAN *et al.*, 2010). Na redução dissimilativa, o íon sulfato atua como agente oxidante para a metabolização da matéria orgânica, da mesma forma que atua o oxigênio na respiração convencional. O

sulfeto produzido pela redução do sulfato é normalmente excretado na forma de  $\text{H}_2\text{S}$  livre (POSTGATE *et al.*, 1984).

O íon sulfato é muito estável e precisa de ativação para então ser reduzido. Esta reação é realizada pela enzima ATP sulforilase, tendo como produto a adenosina-fosfossulfato (APS). Essa reação ocorre tanto no processo dissimilativo quanto no assimilativo. No processo assimilativo a APS é convertida pela enzima APS quinase em fosfoadenosina 5'-fosfossulfato (PAPS) pela adição de fosfato e só então o sulfato é reduzido a sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ). No processo dissimilativo o sulfato contido em APS é reduzido a sulfito pela APS redutase. Em ambos os processos  $\text{SO}_3^{2-}$  é convertido em sulfeto pela sulfito redutase (MADIGAN *et al.*, 2010).

A utilização de substratos orgânicos no metabolismo desses microrganismos pode ser realizada com a sua oxidação completa ou incompleta. Os oxidantes completos são capazes de mineralizar os compostos orgânicos até  $\text{CO}_2$ , já o incompletos convertem a matéria orgânica até acetato. Essas distinções se referem a grupos fisiológicos e não sistemáticos (MARTIN *et al.*, 2006). O metabolismo das BRS é dependente da redução de sulfato, e este processo inicia-se após a entrada do sulfato endógeno no interior da célula.

Esses microrganismos são de fundamental importância nos ciclos biogeoquímicos do carbono e enxofre. Estima-se que cerca de 50% da matéria orgânica despejada em ambientes marinhos possa ser degradada pelas BRS (GIBSON, 1990).

As BRS são encontradas em ambientes aquáticos e terrestres, elas são mais comumente encontradas nos lagos, rios e mares (GIBSON, 1990) embora já tenham sido relatadas em ambientes inóspitos de temperaturas elevadas como fontes hidrotermais e lama vulcânica (ELSGAARD *et al.*, 1994) e locais de alta pressão como fendas oceânicas e sedimentos marinhos (JEANTHON *et al.*, 2002).

No ambiente intestinal de humanos e cupins as BRS têm sido relatadas (GIBSON, MACFARLANE, CUMMING, 1993; KUHNIGK *et al.*, 1996). No intestino humano o hidrogênio produzido pelas primeiras etapas da digestão precisa ser gerenciado, e os grupos bacterianos que usam  $\text{H}_2$  são os metagênicos, acetogênicos e as BRS. De 30 a 50% das pessoas carregam os metagênicos em seus cólons e utilizam a metanogênese como etapa final da mineralização da matéria orgânica, mas algumas pessoas não possuem bactérias desse grupo e nesses casos uma das alternativas para a gerência do  $\text{H}_2$  é a via de redução do sulfato (GIBSON, MACFARLANE, CUMMING, 1993). Em

cupins a abundância das BRS tem se mostrado dependente das características da fonte alimentar (KUHNIK *et al.*, 1996).

### 2.2.5 Metanogênicos

Metanogênicos são microrganismos pertencentes ao um grupo de *Archaea* que produzem metano sob condições anóxicas. Em muitos ambientes estes organismos realizam a etapa final de mineralização da matéria orgânica sendo importantes para o ciclo do carbono. Os metanogênicos utilizam como substrato  $H_2$ ,  $CO_2$ , formato, metanol, metilaminas e acetato (ZEIKUS, 1977). Os metanogênicos são encontrados em turfeiras e pilhas de compostagem de resíduos orgânicos (CHU *et al.*, 2008). Esses microrganismos também são encontradas em intestinos de humanos (SAMUEL *et al.*, 2007), ruminantes (LEAHY *et al.*, 2010), cupins (LEADBETTER, BREZNAK, 1996) e minhocas (DEPKAT-JACOB *et al.*, 2012; SCHULZ *et al.*, 2015).

Metanogênicos foram detectados em numerosos ecossistemas organotróficos: o rúmen e o trato gastrointestinal de animais, sedimentos aquáticos e compostagem (ZEIKUS, 1977). A análise da atividade dos metanogênicos nos sedimentos do lago Mendota, Wisconsin, revelou que a população desses organismos eram metabolicamente ativos entre 4 a 45°C, tendo como temperatura ideal entre 35 a 42°C. A atividade de metanogênese foi limitada *in situ* devido à temperatura (23°C) e variou sazonalmente.

Um metanogênico isolado do lago de Vechten foi cultivado conjuntamente com uma bactéria redutora de sulfato (BRS) e foi possível observar que o acetato produzido pela BRS poderia ser usado pelo metanogênico, porém a BRS produz também sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) que é tóxico. Outros compostos são relatados como inibidores de metanogênicos como sulfato, nitrito, nitrato e acetileno (BALDERSTON, PAYNE, 1976; ZEIKUS, 1977). Esta inibição poderia acontecer pela alteração no fluxo de elétrons devido à redução de aceptores de elétrons alternativos no lugar dos precursores do metano ou poderia pelo composto em si.

A inibição da metanogênese por nitrato e nitrito tem sido investigada, Balderston e Payne (1976) avaliaram a inibição em arqueas causada por nitrito, nitrato, óxido nítrico e óxido nitroso em diferentes concentrações. O maior efeito inibitório sobre a metanogênese foi causado pelo óxido de nitrogênio mais reduzido. Em contraste Bollag e Czlonkowski (1973) encontraram uma ordem reversa do efeito inibitório, sendo o nitrato



o supressor mais forte. Essas diferenças encontradas podem estar relacionadas ao planejamento do experimento; Bollage e Czlonkowski (1973) forneceram glicose como doador de elétron, e os efeitos por eles observados podem estar relacionados à diferença na taxa de produção em vez do uso de  $H_2$  e  $CO_2$  na presença de óxidos de nitrogênio. Tanto  $H_2$  e  $CO_2$  foram fornecidos em excesso no experimento realizado por Balderston e Payne (1976), levando eles a considerarem que o efeito inibitório sobre a metanogênese seria causada pela inibição de algum componente, provavelmente uma enzima.

Em sedimentos marinhos a metanogênese foi inibida até a depleção de sulfato e o mesmo foi observado em sedimentos de lago. Cappenberg (1975) propôs que a inibição da metanogênese causada pela adição de sulfato (0,1%) foi devido a produção de  $H_2S$ . Winfrey e Zeikus (1976) observaram que o efeito inibitório causado pelo sulfato é revertido pela adição de  $H_2$  e acetato. Além disso, o rastreamento com  $[C^{14}]$  mostra que o acetato é convertido a  $CH_4$ . Eles propuseram a competição por  $H_2$  e acetato como o mecanismo da inibição causada pelo sulfato.

Os efeitos observados das relações entre arqueas metanogênicas e os compostos de óxido de nitrogênio e sulfato podem ter implicações ecológicas sobre as arqueas metanogênicas e sobre o ciclo do carbono. As relações entre os metanogênicos com outros grupos bacterianos tem se demonstrado dinâmica e dependente das condições ambientais.

## **2.3 Abordagem Metagenômica e Metatranscriptômica**

Os microrganismos atuam em diversos processos como fixação biológica do nitrogênio, desnitrificação, produção de metano e ciclagem do carbono, entre outros, sendo, portanto fundamentais na manutenção dos ecossistemas. Um grande esforço tem sido realizado para a compreensão de como a perda da biodiversidade dos microrganismos causa impacto sobre o funcionamento dos ecossistemas e a influência desta perda sobre os bens e serviços que os ecossistemas podem prover. Além disso, os microrganismos podem estar associados com hospedeiros macroscópicos e essa associação pode interferir com a fisiologia do hospedeiro. Os organismos que residem dentro do ecossistema intestinal (microbioma) são definidos por fatores fisiológicos e ambientais, tais como genótipo, habitat e dieta do hospedeiro (MANDAL, SAHA, DAS, 2015).

A ecologia microbiana pode ser investigada por diferentes abordagens. Vários esforços foram feitos para estudar a microbiota intestinal usando as técnicas clássicas de microbiologia. Gordon e colaboradores (2007) identificaram 86 espécies cultiváveis em colônias humanas da microbiota de três adultos saudáveis. Bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Clostridium* spp, *Spirocheata* spp, *Azotobacter* spp, *Micrococcus* spp, *Acinetobacter* spp (IDOWO; EDEMA; ADEYI, 2005) tem sido isoladas de intestino de minhoca, e a presença e ausência dessas bactérias foi dependente do tipo de solo em que as minhocas se encontravam. OWA e colaboradores (2013) conseguiram isolar do intestino da minhoca *Libyodrilus violaceus* nove espécies de bactérias.

No entanto, as estratégias utilizando as técnicas clássicas de microbiologia tem se mostrado limitadas devido a incapacidade de cultivar a maioria dos microrganismos. Estima-se que cerca de 99% dos microrganismos presentes no solo não podem ser cultivados utilizando as técnicas usuais de microbiologia (TORSVISK; OVREAS; THINGSTAD, 2002).

Recentemente, as técnicas de sequenciamento de DNA independentes do cultivo de microrganismos mudaram os estudos de biodiversidade ambiental clássicos. Os avanços nas técnicas de extração de DNA presentes no ambiente, sem a necessidade de cultivar os microrganismos ali presentes, juntamente com os avanços nas tecnologias de sequenciamento de DNA e barateamento do custo, além do desenvolvimento de programas de computadores para analisar as quantidades maciças de dados permitiram um aumento significativo do conhecimento das comunidades microbianas de diversos ambientes.

A Metagenômica é a técnica que permite o estudo dos genomas microbianos coletivos contidos em um determinado ambiente sem a necessidade de cultivo dos organismos (HANDELSMAN *et al.*, 1998). Inicialmente o termo foi utilizado apenas para a análise funcional que consiste na anotação dos genes identificados a partir de comparação com banco de dados e é baseada na sequência dos genomas microbianos coletivos contidos em uma amostra ambiental. Porém, atualmente também é amplamente aplicada a estudos que realizam amplificação de reação de cadeia da polimerase (PCR) de certos genes de interesse. O primeiro pode ser referido como "metagenômica ao acaso" e a última como "metagenômica de amplificação de genes específicos" (SHARPTON, 2014).

O estudo da biodiversidade pode ser realizado por análise de um gene específico, e esta técnica é a mais difundida e computacionalmente eficiente (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012; OULAS *et al.*, 2015). O procedimento envolve a comparação das sequências metagenômicas com as sequências pertencentes a um banco de dados, assim identificando as sequências que são homólogas ao gene. Os genes mais utilizados neste tipo de análise são os genes RNAr ou genes que codificam proteínas de uma única copia e são comuns nos genomas microbianos (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012; OULAS *et al.*, 2015).

A anotação funcional metagenômica, a qual possibilita a caracterização do potencial bioquímico da comunidade microbiana, pode ser executada em dois estágios. Primeiramente, é realizada a predição dos genes codificantes e, uma vez identificados, estes genes são submetidos à anotação funcional. Na etapa de predição de genes, os genes são identificados como sequências de DNA codificantes. As ferramentas usadas para a predição de genes usam informações como códon de início (AUG) e códon de parada (UAA, UAG e UGA) para identificar os quadros de leitura aberta (*ORF*, de *open reading frame* em inglês) e o sítio de ligação de ribossomo (RBS). Quadro de leitura aberta é a designação para a região da sequência de DNA que possui potencial para ser traduzida em uma proteína específica (THOMAS, GILBERT, MEYER, 2012; OULAS *et al.*, 2015). A próxima etapa é a atribuição funcional dos genes codificantes. Este passo consiste na busca por homologia de sequências contra um banco de dados que contenha informações funcionais. Devido ao grande tamanho dos conjuntos de dados metagenômicos este estágio costuma ter um custo computacional alto e ser automatizado (OULAS *et al.*, 2015).

A metagenômica aumentou rapidamente as informações sobre a composição e a potencial função das populações de bactérias de diversos ambientes, como intestino humano (WEI-LIN WANG, *et al.*, 2015., JOVEL *et al.*, 2016), intestino de camundongos (BROWN *et al.*, 2011), intestino de cupins (HONGO, ONKUMA e KUDO, 2003), coprólito de minhocas (AIRA *et al.*, 2016), rúmen de bovinos, sedimento aquífero (CASTELLE *et al.*, 2013) e sistemas de água doce (STEFFEN *et al.*, 2012). Os estudos de metagenômica do intestino humano tem revelado uma sofisticada relação entre microbiota, sistema imunológico do hospedeiro e metabolismo (MEJÍA-LEÓN e LA BARCA, 2015; WEI-LIN WANG, *et al.*, 2015; JOVEL *et al.*, 2016).

A metagenômica tem se mostrado uma técnica altamente eficiente na identificação de novos genes, vias metabólicas microbianas, estudo da relação entre doenças e hospedeiro, diversidade microbiana, interação entre hospedeiro e microbiota e coevolução entre hospedeiro e microbiota. No entanto, existem limitações quanto ao uso desta ferramenta. Primeiramente, requer uma alta cobertura das sequências para as análises de 16S rDNA, o que torna o custo e o tempo dispendido maior nos projetos de metagenomas do que em projetos de análise de biodiversidade de gene específico, no caso o 16S rDNA. Em segundo, para realizar o estudo com êxito a qualidade da anotação funcional das sequências metagenômicas é importante. No entanto, uma proporção significativa das sequências não recebe uma atribuição funcional. Além disso, existe uma dificuldade maior na montagem de sequências longas para os membros menos abundantes ou comunidades que contenham espécies extremamente próximas (WEI-LIN WANG, *et al.*).

O entendimento das relações funcionais pode ser aumentado pela análise da expressão gênica. O estudo dos transcritos de uma determinada comunidade microbiana pode fornecer informações do perfil da atividade funcional, o que é importante para identificar os papéis desempenhados pelos microorganismos da comunidade (FRANZOSA *et al.*, 2014; MEN *et al.*, 2017). Metatranscriptômica é a técnica que permite o acesso ao conjunto dos transcritos de uma comunidade sem a necessidade de cultivo. As microbiotas da boca e do intestino de humanos são as mais bem estudadas e o metatranscriptoma desses habitats tem sugerido que a atividade funcional pode variar amplamente entre os hospedeiros e fatores ambientais. As análises metatranscriptômicas do microbioma intestinal durante a exposição a intervenções dietéticas (MCNULTY *et al.*, 2011) e xenobióticas (MAURICE; HAISER; TURNBAUGH, 2013) revelaram alterações significativas da comunidade microbiana no perfil de expressão de genes, mas muitas vezes sem grandes mudanças na estrutura geral da comunidade.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

Analisar a microbiota bacteriana presente em diferentes partes/regiões do intestino das espécies de minhocas *Perionyx excavatus* e *Dichogaster annae* e seus coprólitos a partir de sequenciamento do gene 16S rRNA. Analisar o potencial metabólico para a degradação da matéria orgânica do intestino das minhocas através de sequenciamento genômico global.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar diferentes métodos de extração de DNA total para amostras de intestino de minhoca.
- Analisar a estrutura da comunidade microbiana de diferentes porções do intestino das espécies de minhocas *P. excavatus* e *D. annae* e de seus coprólitos.
- Analisar os genes a partir das amostras do intestino de duas espécies de minhoca usando sequenciamento metagenômico.
- Analisar os genes transcritos do intestino de *P. excavatus* usando sequenciamento transcriptômico.

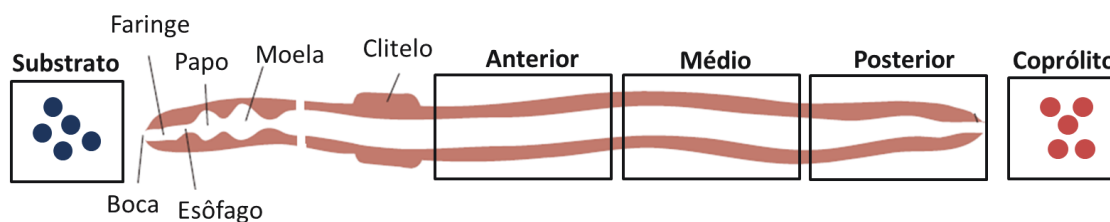
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Minhocas

As espécies de minhocas, *Perionyx excavatus* e *Dichogaster annae*, foram adquiridas da Empresa Minhobox (Juiz de Fora, MG) que trabalha com criação de minhocas para diversas finalidades como jardinagem, pescaria, aquarismo, avicultura e minhocultura. Utilizaram-se indivíduos apenas adultos. A espécie *P. excavatus* tem tamanho entre 20-120 mm e clitelo nos segmentos 13-17 enquanto que a *D. annae* possui tamanho entre de 46-62 mm e clitelo nos segmentos 16-21. Ambas as espécies pertencem ao grupo ecológico epigéica e são usadas para minhocultura.

### 4.2 Coleta das amostras

As amostras de DNA foram coletadas do substrato, do conteúdo intestinal e do coprólito de ambas as espécies de minhocas. O substrato é referente ao material ofertado como alimento para as minhocas, este material é constituído de esterco bovino pré compostado. Antes da realização da coleta das amostras de DNA as minhocas ficaram em repouso por uma semana em sala climatizada 18°C. Para a coleta dos coprólitos, as minhocas foram lavadas três vezes em água estéril, 21 indivíduos de cada espécie foram colocados em placas Petri contendo papel filtro, ambos estéreis, após 3 horas o conteúdo produzido foi coletado. Para a coleta do material do intestino os animais foram sacrificados por imersão em álcool 92.8%. Para a análise metagenômica o intestino foi dividido em três porções de mesmo tamanho sendo nomeados de intestino anterior, intestino médio e intestino posterior, sendo o material coletado a partir do terceiro anel depois do clitelo, como mostra a figura 1. Cada amostra biológica para a extração de DNA representa a coleta de material de 15 e 30 indivíduos de *P. excavatus* e *D. annae*, respectivamente. Para a análise metatranscriptômica, as amostras foram coletadas do conteúdo total do intestino apenas da espécie *P. excavatus*, sendo cada amostra biológica representada por 4 indivíduos. Imediatamente após a coleta, as amostras foram congeladas por nitrogênio líquido. Todas as amostras foram armazenadas em freezer -80°C.



**Figura 1: Modelo da coleta das amostras.** Desenho esquemático indicando a coleta das amostras que foram utilizadas para a extração de DNA total para análise de biodiversidade microbiana. O esquema indica as regiões do intestino denominadas anterior, média e posterior. O substrato é esterco bovino pré compostado que foi ofertado como alimento para as minhocas. Fonte: Drake; Horn, 2007-adaptado.

#### 4.3 Extração do DNA total

O DNA metagenômico das amostras das três porções do intestino das espécies de minhoca *Perionyx excavatus* e *Dichogaster annae* foi extraído usando sete diferentes métodos: M1 a M7 indicados na Tabela 1. O método M1 corresponde a um kit comercial para extração de DNA do solo e o método M2 corresponde a um kit comercial para extração de DNA de fezes. O método M6 está descrito na tabela 2 e o método M7 é correspondente ao descrito por Griffiths e colaboradores (2000) com modificações e é apresentado na tabela 3.

A extração do DNA utilizando o método M7 foi realizada através do método direto (M7a) e indireto (M7b). No procedimento para o método indireto, 1 mL de solução SET (100 mM EDTA pH 8, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl) foram adicionados em 200 mg de amostra e misturados por inversão. Em seguida o material particulado foi separado da amostra através de centrifugação diferencial, a amostra foi centrifugada a 500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente (centrifuga Eppendorf 5804 R). O sobrenadante contendo as células procarióticas foi transferido para um novo tubo e a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente (centrifuga Eppendorf 5804 R). O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspensão em 200  $\mu$ L de solução de lise; em seguida foram adicionados 200  $\mu$ L de fenol seguido de agitação por vortex por 30 segundos. Segue-se a partir da etapa 3 do protocolo do método M7 (Tabela 3).



**Tabela 1:** Métodos usados para a extração de DNA das amostras de intestino e coprólito de minhocas.

Método	Metodologia	Lise Celular	Remoção das substâncias húmicas
M1	conforme MO-Bio Kit (Power Soil DNA Isolation Kit)	conforme MO-Bio Kit	conforme MO-Bio Kit
M2	conforme QIAGEN Kit (QIAmp DNA Stool mini Kit)	conforme QIAGEN Kit	conforme QIAGEN Kit
M3	EDTA, SDS, NaCl (Sagar <i>et al.</i> , 2014)	Vortex, Aquecimento (72°)	PEG
M4	CTAB, polivinilpirrolidona, NaCl, 2-mercaptoetanol (Karnataka, 2009)	Aquecimento (37°)	CTAB, polivinilpirrolidona, fenol, clorofórmio
M5	conforme Invitrogen (Reagente DNAzol - Invitrogen)	conforme Invitrogen	conforme Invitrogen
M6	SDS, NaCl (no presente trabalho)	Vortex, Aquecimento (65°)	Fenol, clorofórmio
M7a* M7b**	CTAB, polivinilpirrolidona, NaCl, 2-mercaptoetanol, fenol (no presente trabalho)	Vortex, Aquecimento (65°)	CTAB, polivinilpirrolidona, fenol, clorofórmio

\* Método direto: a primeira etapa constitui a lise celular.

\*\* Método indireto: a primeira etapa constitui a centrifugação diferencial.

**Tabela 2:** Método 06 de extração de DNA de intestino e coprólito de minhocas apresentado neste trabalho.

Etapas	Procedimento
1	Pesar 200 mg de amostra.
2	Adicionar 200 µL de TE, 1 M NaCl e SDS 2%. Vortex 30 segundos.
3	Incubar por 10 minutos a 65°C. Vortex 30 segundos. Centrifugar por 5 minutos a 15.000 x g.
4	Transferir o sobrenadante amarelo-marrom para um novo tubo
5	Adicionar 100 µL fenol:clorofórmio (25:24). Centrifugar por 5 minutos a 15.000 x g. Transferir a fase aquosa para um novo tubo.
6	Adicionar 100 µL fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Centrifugar por 5 minutos a 15.000 x g. Transferir a fase aquosa para um novo tubo.
7	Adicionar 100 µL fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Centrifugar por 5 minutos a 15.000 x g. Transferir a fase aquosa para um novo tubo.
8	Adicionar 0,6 volume de isopropanol. Centrifugar por 15 minutos a 15.000 x g. Descartar sobrenadante
9	Adicionar 500 µL de etanol 80%. Centrifugar por 15 minutos a 15.000 x g.
10	O pellet de DNA foi suspenso em 50-100 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA).

Na extração de DNA através do método M7 direto o material resultante possui coloração o que indica presença de contaminantes, sendo necessária uma etapa de

purificação do DNA utilizando-se o kit para extração de DNA de solo da MO-Bio (Power Soil DNA Isolation Kit).

Dois tipos de sequenciamento de DNA foram realizados: o sequenciamento do DNA global da amostra que foi utilizado para a anotação funcional com o objetivo de caracterização fisiológica da comunidade e identificação de genes codificantes para enzimas hidrolíticas, e o sequenciamento do gene 16S rRNA para análise de biodiversidade. Para a análise de biodiversidade, o método M7 direto (M7a) foi escolhido para realizar as extrações de DNA. Para o sequenciamento global o método M7 indireto (M7b) foi escolhido para as extrações de DNA.

**Tabela 3:** Método M7 para extração de DNA de intestino e coprólito de minhocas modificado do protocolo descrito por Griffiths e colaboradores (2000).

Etapa	Procedimento
01	Pesar 200 mg de amostra.
02	Adicionar 200 µL de tampão de lise (1% CTAB; 5% polivinilpirrodiona; 1,4 M NaCl; 20 mM 2-mercaptoetanol) e 200 µL de fenol. Vortex por 30 segundo.
03	Incubar por 30 minutos a 65°C. Vortex por 30 segundos. Centrifugar por 5 minutos a 15.000 x g.
04	Transferir o sobrenadante amarelo-marrom para um novo tubo.
05	Adicionar 100 µL fenol:clorofórmio (25:24). Centrifugar por 5 minutos a 15.000 x g. Transferir a fase aquosa para um novo tubo.
06	Adicionar 100 µL fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Centrifugar por 5 minutos a 15.000 x g. Transferir a fase aquosa para um novo tubo.
07	Adicionar 100 µL clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Centrifugar por 5 minutos a 15.000 x g. Transferir a fase aquosa para um novo tubo.
08	Adicionar 0,6 volume de isopropanol. Centrifugar por 15 minutos a 15.000 x g. Descartar sobrenadante.
09	Adicionar 500 µL de etanol 80%. Centrifugar por 15 minutos a 15.000 x g.
10	O pellet de DNA foi suspenso em 50-100 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA).

## 4.4 Análise da qualidade do DNA

### 4.4.1 Eletroforese de DNA

A avaliação da integridade do DNA foi realizada através de eletroforese em gel horizontal como descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989). O gel de agarose com concentração de 0,7% foi corrido em cuba contendo 100 ml tampão TAE 1X (Tris base 40 mmol/L; ácido acético 40 mmol/L; EDTA 2 mmol/L; pH 8,0), voltagem de 50V (gel – 10 cm), com tempo de corrida de aproximadamente 3 horas. As amostras foram

diluídas em tampão F.E.F SUDS (azul de bromofenol 0,025%; xilenocianol 0,025%; SDS 0,1%; Ficoll® 20%, em tampão TE) (SAMBROOK *et al.*, 1989). O marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas) foi utilizado para determinação dos tamanhos dos fragmentos de DNA. Após o tempo de corrida, o gel foi incubado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 15 minutos e o DNA visualizado sob luz ultravioleta (302 nm) em transiluminador UV. As imagens foram obtidas utilizando o EC3™ Imagem System - UVP BioImaging Systems.

#### 4.4.2 Quantificação de DNA

Para a quantificação do DNA foram utilizados fluorimetria e medidas de absorbância na região do ultravioleta.

A concentração e grau de pureza do DNA extraído das amostras foram estimadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000/2000c (Thermo Scientific). As absorbâncias foram determinadas nos comprimentos de onda 230, 260 e 280 nm e as razões de absorbância de A260/A280 e A260/A230 foram usadas para determinar a contaminação de proteína e de compostos polifenólicos e polissacarídicos, respectivamente.

A concentração de DNA também foi estimada por quantificação fluorimétrica através do fluorímetro Qubit da Thermo Fisher Scientific. O sistema utilizado foi “Qubit™ dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit”, seguindo-se as recomendações do fabricante.

#### 4.4.3 Amplificação de DNA por PCR

As reações de amplificação com o objetivo de avaliar qualitativamente os métodos de extração testados foram feitas em termociclador Mastercycler® (Eppendorf). A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando os iniciadores Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') e Y2 (5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') para as amostras extraídas pelos métodos M1 a M6. Os sistemas de reação continham enzima *Taq* DNA polimerase (1-5 unidades por reação de 20-100µL), tampão de PCR 10 X *Taq* Buffer + KCl (100 mM Tris-HCl (pH8,8); 500 mM KCl; 0,8% (v/v) Nonidet P40), dNTPs 0,2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol/L

e 5-10 pmol de oligonucleotídeos iniciadores (AZEVEDO *et al.*, 2003-adaptado). O programa utilizado no termociclador foi 94°C a 4 minutos para desnaturar o DNA, com amplificação por 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 62°C por 45 segundos, 72°C por 90 segundos; uma extensão final de 10 minutos a 72°C foi adicionada para garantir uma completa da amplificação.

A amplificação do gene 16S rRNA foi também realizada utilizando os iniciadores 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTA-3') e 806R (3'-GGATACHVGGGTWTCTA-5') para as amostras extraídas pelo método M7a. Os sistemas de reação continham enzima Go *Taq* DNA polimerase 1-5 unidades por reação de 20-100µL, tampão de PCR 5 X Go *Taq* Buffer; dNTP 0,2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mmol/L e 5-10 pmol de oligonucleotídeos iniciadores (AZEVEDO *et al.*, 2003-adaptado). O programa utilizado no termociclador foi 94°C a 3 minutos para desnaturar o DNA, com amplificação por 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 50°C por 60 segundos, 72°C por 90 segundos; uma extensão final de 10 minutos a 72°C foi adicionada para garantir uma completa da amplificação.

#### 4.5 Construção das bibliotecas metagenômicas e sequenciamento do DNA

A biblioteca Metagenômica do gene 16S rRNA foi construída a partir dos fragmentos do gene obtidos por amplificação via PCR das amostras. A região variável quatro (V4) do gene 16S rRNA foi amplificada a partir das amostras purificadas utilizando os iniciadores 515F (5'-AATGATACGGCGACCACCGA GACGTACGTACGGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA -3') e 806R (3'-TAATCTWTGGGVHCAATCAGGCCGACTGACTGATTGCGTGCGATCTAGAGCAT ACGGCAGAAGACGAAC - 5') (CAPORASO *et al.*, 2010). A reação de PCR e o sequenciamento de DNA foram realizados de forma semelhante à descrita por Caporaso e colaboradores (2011). As reações de PCR continham 5 µL de KlenTaq Mix, 1 µL de cada iniciador direto e inverso (10 pmol de concentração final), 10 ng de DNA e volume final da reação 10 µL. As reações foram mantidas a 94°C durante 3 min para desnaturar o DNA, com processo de amplificação durante 18 ciclos a 94°C durante 45 s, 50°C durante 30 s e 68°C durante 1 min; Uma extensão final de 10 min a 72°C foi adicionada. Os amplificados obtidos das amostras das três porções do intestino e do coprólito de ambas

as minhocas foram sequenciados na plataforma MiSeq da *Illumina Inc.* seguindo as recomendações do fabricante.

Para o sequenciamento de DNA global as amostras da região anterior e média do intestino foram agrupadas formando uma única amostra. Portanto, para o sequenciamento global cada espécie de minhoca compôs duas bibliotecas, uma biblioteca contendo a região anterior e média, e uma segunda biblioteca contendo somente a região posterior. O DNA isolado das amostras foi processado para sequenciamento utilizando o sistema “Plus Fragment Library Kit” da Thermo Fisher Scientific, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. As bibliotecas metagenômicas foram sequenciadas na plataforma Ion Proton.

#### **4.6 Extração do RNA**

A extração do RNA total foi realizada solubilizando a amostra em 2 mL do reagente Trizol e 500 µL de solução de lise (CTAB 1%, EDTA 0,5 mM pH 8, Tris-HCl 0,05 M pH 8 e NaCl 1,4 M). Na sequência, a amostra foi centrifugada (12.100 x g, 5 min) e a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo. Em sequência foi utilizado o kit RNeasy Mini Kit da Qiagen e seguiu-se com protocolo, conforme as recomendações do fabricante, a partir da etapa 4.

#### **4.7 Tratamento do RNA extraído com DNase**

O RNA extraído é tratado com DNase para eliminar qualquer vestígio de DNA genômico. Foi adicionado às amostras de RNA tampão DNase e 2 µL de DNase I (2U/µL - Ambion). A mistura foi incubada em banho seco a 37 °C por no mínimo 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 20% do volume da amostra de solução inativante (*DNase Inactivation Reagent*) e mantida a temperatura ambiente por 2 minutos (homogeneizada vigorosamente duas vezes neste período). Após incubação, a mistura foi centrifugada (12.100 x g) por 60 segundos para sedimentar a solução inativante. O sobrenadante, contendo o RNA, foi transferido para um novo tubo. A concentração de RNA foi determinada através de espectrofotômetro (Nanodrop® ND-1000 Technologies).

#### **4.8 Eletroforese de RNA**

Para analisar o RNA extraído foi realizada eletroforese em gel horizontal como descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989). O gel de agarose com concentração de 1% foi corrido em cuba contendo 100 ml tampão TBE 1X (Tris base 16,2g/L; ácido bórico 2,75g/L; EDTA 0,95g/L; pH 8,0) livre de RNase, voltagem de 60V, com tempo de corrida de aproximadamente 40 minutos. Após o tempo de corrida, o gel foi incubado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 15 minutos e o RNA visualizado sob luz ultravioleta (302 nm) em transiluminador UV. As imagens foram obtidas utilizando o EC3TM Imagem System - UVP BioImaging Systems.

#### **4.9 Depleção de rRNA**

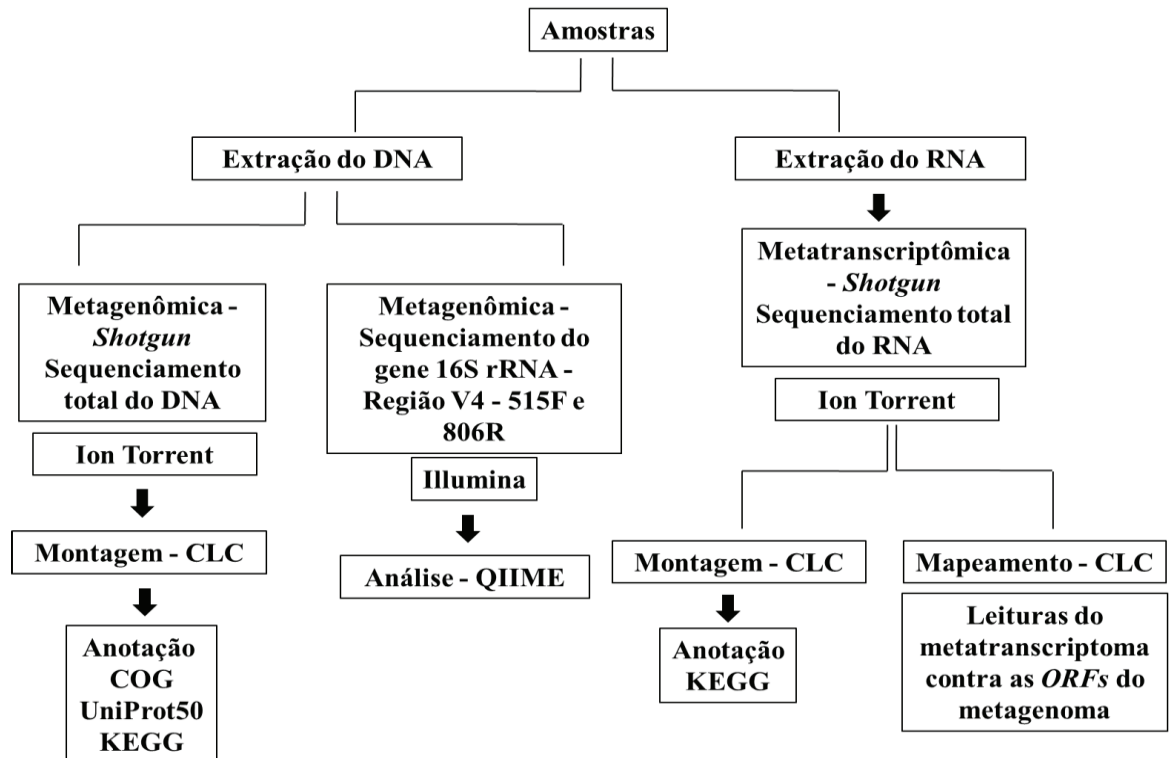
O RNA total foi depletado de RNA ribossomal utilizando o kit MICROBExpressTM (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.10 Construção e sequenciamento das bibliotecas de cDNA**

O RNA depletado de rRNA foi utilizado para a construção das bibliotecas de cDNA. Para a construção das bibliotecas foi utilizado o kit Ion total RNA-seq kit v2 for Whole Transcriptome Library, seguindo as orientações do fabricante. As bibliotecas de cDNA foram processadas para sequenciamento utilizando o sistema Ion PI<sup>TM</sup> Hi-Q<sup>TM</sup> OT2 200 Kit, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. As bibliotecas de cDNA foram sequenciadas na plataforma Ion Proton.

#### **4.11 Processamento dos dados**

Para analisar e integrar o conjunto de dados ômicos foram utilizadas diversas abordagens que se encontram resumidos na Figura 2.



**Figura 02: Fluxograma dos métodos de análise ômica.** Cada tipo de abordagem molecular, metagenômica e metatranscriptômica, é mostrada seguida das abordagens de bioinformáticas que foram usadas para análise dos diversos conjuntos de dados.

#### 4.11.1 Metagenômica

##### 4.11.1.1 Análise do gene 16S rRNA

Os dados brutos obtidos no sequenciador MiSeq Illumina foram convertidos e extraídos do servidor em formato Fasta para que pudessem ser analisados.

As sequências foram analisadas utilizando-se o programa QIIME versão 1.9.1 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (CAPORASO *et al.*, 2010), no qual foram empregadas linhas de comando específicas conforme as análises desejadas. Deste modo, o agrupamento das OTUs (Operational Taxonomic Units) foi realizado pelo método *open-reference OTU picking*, empregando-se o comando *pick\_open\_reference\_otus.py*. Através deste único comando foi realizado o agrupamento das OTUs, o alinhamento, a classificação taxonômica e obtida a tabela de OTUs. As OTUs foram definidas usando 97% de similaridade. O método *uclust* (EDGAR, 2010) foi usado para agrupar as sequências. A atribuição taxonômica foi determinada pelo método *uclust* (EDGAR, 2010). O alinhamento de sequências foi realizado por PyNAST (CAPORASO *et al.*,

2010). Para a representação da tabela OTU, QIIME usa o formato BIOM (Genomics Standards Consortium Biological Observation Matrix) (MCDONALD *et al.*, 2012). O banco de dados usado como referência foi o SILVA (QUAST *et al.*, 2013).

A análise de diversidade foi realizada empregando-se o comando *core\_diversity\_analyses.py*. Foram obtidas entre 6636 e 303301 sequências de qualidade por amostra para todas as 27 amostras. Para calcular a Alfa e Beta diversidade foi selecionado aleatoriamente um subconjunto de 6.000 sequências por amostra. A métrica usada para calcular a Alfa diversidade foi número de OTUs (sobs). A Beta diversidade foi calculada com base na matriz de distância UniFrac (LOZUPONE; KNIGHT, 2005; Lozupone *et al.*, 2006), comparando as amostras com base na medida de distância filogenética das OTUs. Os resultados foram plotados como gráficos de Análise de Coordenadas Principais (Principal Coordinates Analysis – PcoA), sendo dois gráficos gerados, um gráfico PCoA não ponderado (presença ou ausência de OTUs) e um PCoA ponderado (considera a abundância das OTUs). A tabela OTU foi plotada na forma de mapa de calor com a função *make\_otu\_heatmap.py* de QIIME 1.9.1 (CAPORASO *et al.*, 2010).

A análise de network foi realizada em nível de gênero usando QIIME 1.9.1 (CAPORASO *et al.*, 2010) e plotados com Cytoscape 3.5 (SHANNON *et al.*, 2003). A análise de network é usada para visualizar como as OTUs são compartilhadas entre as amostras. Um teste-G para independência é usado para testar se os nós da amostra dentro das categorias (no nosso caso, cada região de intestino e substrato) estão mais conectados dentro de um grupo do que o esperado pelo acaso.

As diferenças na abundância relativa das bactérias pertencentes às comunidades das amostras foram avaliadas por teste de ANOVA uma via. O teste de múltiplas comparações foi realizado através de Tukey. Ambas as análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism.

#### **4.11.1.2 Sequenciamento genômico global**

Todas as sequências “brutas” geradas pelo sequenciador PGM foram automaticamente refinadas ("trimmed") aplicando-se os parâmetros padrão do servidor do Ion Torrent para remover as sequências dos adaptadores. As sequências também foram refinadas utilizando o grau de qualidade Phred, o qual é definido como  $Q = -10\log_{10}(P)$ ,



onde P é a probabilidade de erro da base chamada. Assim o grau de qualidade indica a probabilidade de uma determinada base tenha sido corretamente identificada no sequenciamento como mostra a tabela 4. Através do CLC Genomics Workbench, versão 7, as sequências foram refinadas utilizando os parâmetros: grau de qualidade e tamanho das sequências. Sendo assim as sequências de baixa qualidade ( $Q < 30$ ) e as sequências curtas ( $< 30$  bp) foram descartadas.

**Tabela 4:** Graus/Níveis de qualidade Phred.

Qualidade Phred	Probabilidade de erro (base)	Acuidade
10	1 em 10	90%
20	1 em 100	99%
30	1 em 1.000	99.9%
40	1 em 10.000	99.99%
50	1 em 100.000	99.999%
60	1 em 1.000.000	99.9999%

As sequências refinadas e de alta qualidade de cada biblioteca foram montadas formando sequências mais longas denominadas *contigs*, o método *de novo* foi usado para a montagem dos *contigs* através do CLC Genomics Workbench versão 7. As sequências foram montadas de acordo com os parâmetros: custo de incompatibilidade 2, custo de inserção 3, custo de deleção 3, comprimento da fração 0.5, similaridade 0.8 e tamanho mínimo do *contig* 200.

A anotação foi realizada em duas etapas: anotação estrutural e anotação funcional. A anotação estrutural foi realizada através de predição de *ORF* (*open reading frame*) usando o programa Prodigal 2.0 no modo meta. A anotação funcional foi realizada através de BLASTp contra o banco de dados do COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) e UniRef [Uniprot (Universal Protein Resource) Reference Clusters], sendo utilizado a base de dados do UniRef50 que é construído pelo agrupamento das sequências *seed* do UniRef90 que possuam pelo menos 50% de identidade e 80% de sobreposição. O COG tem sido aceito como um banco de dados de classificação filogenética de proteínas de genomas completos, sendo que cada COG inclui proteínas identificadas como ortólogas e são conectadas através da ascendência evolutiva vertical. Além disso, o COG

é classificado dentro de 17 categorias, alguns COGs de função conhecida são organizados para representar vias bioquímicas e sistemas celulares (TATUSOV *et al.*, 2001). O UniProt é um banco de dados de acesso livre que fornece sequência de proteína e informação funcional. O UniRef é formado por três banco de dados (UniRef100, UniRef90 e UniRef50) de conjuntos agrupados de sequências do UniProtKB e também registros selecionados do UniParc (WU *et al.*, 2006). O resultado da anotação realizada contra o banco de dados do COG foi distruibuida de acordo com as 17 categorias do COG. O resultado da anotação contra o banco de dados do UniRef50 foi anotado novamente através de BLASTp contra o banco de dados COG para que fosse possível realizar a classificação das *ORFs* anotadas de acordo com as categorias do COG.

**Tabela 5:** Organismos padrão KEGG. Representantes do conjunto padrão dos organismos procariotos e seus códigos de referência. Os genomas dos organismos apresentados na tabela correspondem ao conjunto usado pelo servidor automático do KEGG, o KAAS, para a anotação.

Código	Organismo	Código	Organismo
eco	<i>E. coli</i>	cac	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
sty	<i>Salmonella enterica</i>	mge	<i>Mycoplasma genitalium</i>
him	<i>Haemophilus sp</i>	mtu	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
pae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ctr	<i>Chlamydia trachomatis</i>
nme	<i>Neisseria meningitidis</i>	bbu	<i>Borrelia burgdorferi</i>
lpy	<i>Helicobacter pylori</i>	syn	<i>Synechocysts sp</i>
rpr	<i>Rickettsia prowazekii</i>	aae	<i>Aquifex aeolicus</i>
mja	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	afu	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
bsu	<i>Bacillus subtilis</i>	pho	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
sal	<i>Staphylococcus aureus</i>	ape	<i>Aeropyrum pernix</i>
lla	<i>Lactococcus lactis</i>		
spn	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		

A anotação funcional foi realizada pela ferramenta de anotação interna do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), KOALA (KEGG Orthology And Links Annotation), no modo GhostKOALA. A anotação foi realizada usando o conjunto de genes para Procarioto. A anotação funcional também foi realizada através do servidor de anotação automática do KEGG, o KAAS (KEGG Automatic Annotation Server; <http://www.genome.jp/tools/kaas/>), no modo GhostX e pelo método SHB (single directional best hit). A anotação foi realizada usando o conjunto padrão para procarioto sem os genomas de eucariotos, totalizando 23 genomas (Tabela 5) mais 17 genomas de bactérias adicionais (Tabela 6). O KEGG é uma coleção de bancos de dados de genomas,

vias metabólicas, drogas, doenças e substâncias químicas, os quais estão categorizados em informações de sistemas, genomas, química e saúde. O banco de dados de genes do KEGG é composto por genes provenientes de genomas completos que estão depositados no banco de dados de genoma KEGG, todos os genes do banco de dados de genes KEGG estão agrupados dentro de ortólogos no banco de dados de ortólogos (KO) KEGG. O agrupamento dentro dos ortólogos é importante porque o mapeamento das vias KEGG, módulos KEGG e das hierarquias BRITE é realizado através dos identificadores KO. Vale ressaltar que existem identificadores KO não classificados, os quais as relações de vias, módulos e hierarquias permanecem desconhecidas até o presente momento.

**Tabela 06:** Organismos adicionais KEGG. Organismos, e seus códigos de referência, adicionados no conjunto de genomas padrão usado para a anotação realizada pelo servidor automático KASS.

Código	Organismo	Código	Organismo
sco	<i>Streptomyces coelicolor</i>	ent	<i>Enterobacter sp.</i>
fjo	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	vei	<i>Verminephrobacter eiseniae</i>
chu	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	dds	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
shg	<i>Sphingobacterium sp.</i>	ret	<i>Rhizobium etli</i>
puv	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	bma	<i>Burkholderia mallei</i>
ote	<i>Opitutus terrae</i>	atm	<i>Anaerolinea thermophila</i>
amu	<i>Akkermansia muciniphila</i>	acm	<i>Granulicella tundricola</i>
rba	<i>Rhodopirellula baltica</i>	aha	<i>Aeromonas hydrophila</i>
psl	<i>Pirellula staleyi</i>		

As *ORFs* anotadas usando o banco de dados do KEGG via o sistema KAAS e KOALA receberam identificadores KO (KEGG Orthology), os quais podem ser usados para estabelecer correspondentes para o desenho de diagramas de mapas de vias e módulos do KEGG. Usando a ferramenta *iPath* (*Interactive Pathways Explorer*) versão 3 foi desenhado o mapa das vias metabólicas e vias regulatórias das amostras com o objetivo de se ter uma visão global de toda a anotação.

#### 4.11.2 Metatranscriptoma

Todas as sequências brutas geradas pelo sequenciador PGM foram automaticamente refinadas aplicando-se os parâmetros padrões do servidor do Ion Torrent para remover as sequências dos adaptadores. As sequências foram analisadas quanto ao grau de qualidade e tamanho das sequências através do CLC Genomics

Workbench 7, sendo assim as sequências de baixa qualidade ( $Q < 30$ ) e as sequências curtas ( $< 30$  bp) foram descartadas.

As sequências refinadas e de alta qualidade passaram por etapa de filtragem com o objetivo de mapear possíveis rRNAs remanescentes. Através do CLC Genomics Workbench versão 7, as sequências foram mapeadas contra o banco de dados de RNA ribossomal SILVA [LSURef\_119 e SSURef\_NR99\_119, (QUAST *et al.*, 2003)]. Em seguida, as sequências resultantes passaram por segunda etapa de filtragem com o objetivo de mapear possíveis mRNAs provenientes da minhoca. No entanto, os genomas das minhocas, utilizadas neste estudo, não foram sequenciados ou não se encontram disponíveis. Para a minhoca *P. excavatus* o DNA mitocondrial se encontra sequenciado e disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/EF494507.1>. Até o presente momento existem somente dois genomas de minhocas depositados no NCBI (National Center for Biotechnology Information) das seguintes espécies: *Eisenia fetida* e *Amyntas corticis*. Portanto, a segunda etapa de filtragem foi realizada através do CLC Genomics Workbench versão 7, sendo as sequências mapeadas contra o DNA mitocondrial da espécie alvo e o genoma das duas únicas espécies de minhoca depositadas no NCBI.

As sequências que foram refinadas e passaram pelas etapas de filtragem foram mapeadas contra as *ORFs* obtidas dos dados do metagenoma. O mapeamento foi realizado pelo CLC Genomics Workbench 7 utilizando os parâmetros: custo de incompatibilidade 2, custo de inserção 3, custo de deleção 3, comprimento da fração 0.5 e similaridade 0.8.

As sequências refinadas e de alta qualidade de cada biblioteca foram montadas formando sequências mais longas denominadas *contigs*, o método *de novo* foi usado para a montagem dos *contigs* através do CLC Genomics Workbench versão 7. As sequências foram montadas de acordo com os parâmetros: custo de incompatibilidade 2, custo de inserção 3, custo de deleção 3, comprimento da fração 0.5, similaridade 0.8 e tamanho mínimo do *contig* 200.

A anotação foi realizada em duas etapas anotação estrutural e anotação funcional. A anotação estrutural foi realizada através de predição de *ORF* (*open reading frame*) usando o programa Prodigal 2.0 no modo meta. A anotação funcional foi realizada pela ferramenta de anotação interna do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), KOALA (KEGG Orthology And Links Annotation), no modo GhostKOALA. A anotação foi realizada usando o conjunto de genes para Procarioto.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA é uma etapa crucial para muitos estudos de biologia molecular, incluindo a metagenômica. Existem diversos métodos de extração de DNA a partir de amostras ambientais, incluindo kits comerciais. Os métodos de extração de DNA ambiental são divididos em dois grandes grupos: indireto e direto. No método indireto de purificação de DNA, as amostras são submetidas a vários ciclos de lavagem e centrifugação com o objetivo de separar as células bacterianas da matriz da amostra. Por exemplo: em amostras provenientes de solo, o objetivo desta etapa é separar as células bacterianas das partículas do solo e depois seguir com a etapa de lise. No método direto, a purificação do DNA é realizada com toda a matriz da amostra, ou seja, a etapa de lise ocorre contendo todo material de origem. Normalmente, este método envolve um passo de lise mecânica com o objetivo de desfazer eventuais agregados que são característicos de algumas amostras (alguns tipos de solo) e assim liberar o máximo possível de células em solução e também auxiliar na fragmentação da parede celular de bactérias resistentes à lise química (ROBE *et al.*, 2003; TAN., YIAP, 2009; LOMBARD *et al.*, 2011).

Existe uma série de opções disponíveis de lise celular: enzimática, mecânica e química, sendo possível uma combinação de técnicas. A lise química e a enzimática costumam ser mais brandas quando comparadas a lise mecânica e muitas vezes tem preferência por alguns tipos celulares enquanto que a lise mecânica costuma ser mais uniforme (RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2008; TAN e YIAP, 2009).

Os métodos de lise mecânica incluem esferas (“beads”), micro-ondas, sonicação e/ou aquecimento. Em alguns casos o uso de um tempo maior aplicado na etapa de lise mecânica proporciona um rendimento maior de DNA, porém à custa de uma maior quebra do DNA na maioria dos casos. Uma das maiores desvantagens da lise mecânica intensa é a fragmentação do DNA (RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2008).

Não existe um único método de lise celular para todos os tipos de amostras, os protocolos frequentemente devem ser combinados e/ou modificados. Por exemplo, a extração de DNA de amostras de sedimentos marinhos pela combinação da lise mecânica e química resultou num rendimento maior do que quando empregados os métodos separadamente. O protocolo consiste da homogeneização com esferas por minuto seguido da adição de tampão a base de SDS e incubação a 70°C por uma hora (GRAY e HERWIG, 1996). Picard e colaboradores (1992) obtiveram sucesso na lise de esporos de

*Streptomyces* pela aplicação de três tratamentos consecutivos: ultra sonicação seguido de micro-ondas a quente e choque térmico.

Atualmente não existe disponível um kit comercial específico para a extração de DNA dos coprólitos e do conteúdo intestinal de minhoca. Uma alternativa que tem sido colocada em prática é o uso de kits para extração de DNA de solo. As vantagens do uso de kit costumam ser a rapidez do processo e o grau de pureza do DNA extraído.

### **5.1 Avaliação de métodos de extração de DNA total**

Neste trabalho, amostras de três diferentes porções do intestino da espécie de minhoca *Perionyx excavatus* tiveram o DNA extraído utilizando sete diferentes métodos, incluindo kits comerciais e métodos manuais utilizando os detergentes SDS ou CTAB. As amostras de DNA obtidas foram comparadas em termos de qualidade e quantidade, e também foram testados para eficiência de amplificação do gene 16S rRNA por PCR. Também foi avaliada a eficiência na extração de DNA de alta massa molecular uma vez que DNA muito fragmentado inviabiliza o processo de montagem de sequências longas após o sequenciamento global das amostras, etapa essencial para estudos de prospecção *in silico* e clonagem de genes.

De acordo com as medidas de concentração obtidas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop, obteve-se o maior rendimento de DNA utilizando o método M4, seguido do método M6, M3, M2, M7b, M7a, M2 e M1 (Tabela 7). Exceção para a região posterior que teve o maior rendimento pelo método M6. No entanto, de acordo com a análise obtida através de eletroforese, os métodos M3, M4 e M6 apresentaram os menores rendimentos de DNA (Figura 3). Para análise de eletroforese foi padronizado a aplicação no gel de agarose de 5 µL de cada extração de DNA testada. Este padrão foi seguido porque os valores obtidos de concentração das amostras pelo Nanodrop estavam superestimados.

As taxas de rendimento mensuradas no Nanodrop não correspondem aos resultados obtidos pela eletroforese. O método M4 foi o que teve maior rendimento pelo Nanodrop enquanto que pela eletroforese foi um dos métodos com menor rendimento. Possivelmente o efeito superestimado das dosagens se deveu à coloração apresentada pelas amostras. A coloração dos precipitados de DNA foi diferente para cada método e variou amplamente, desde o incolor até o marrom escuro (Tabelas 7 e 8). Este efeito foi

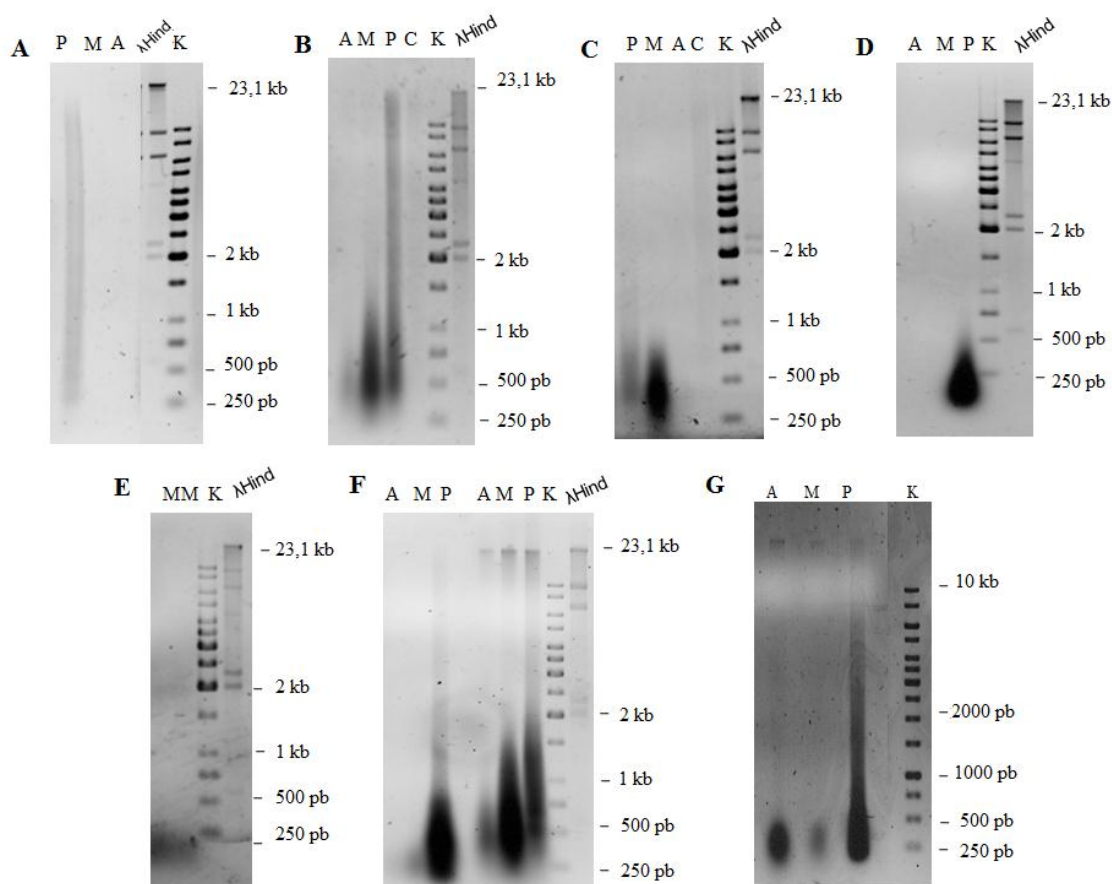
avaliado para as extrações realizadas pelo método M7a, e na Tabela 8 é possível verificar a qualidade do DNA antes e depois da etapa de purificação de todas as triplicatas biológicas, a qual eliminou a coloração das amostras extraídas. O resultado obtido dessa avaliação mostra uma queda dos valores de rendimento após a purificação; parte desta baixa nos valores se deve a perda do material durante o processo como pode ser visualizado pelo resultado da eletroforese (Figuras 5 e 6) do material antes e depois dessa etapa. No entanto, a grande diferença entre os valores de rendimento não pode ser justificado apenas pelo material perdido durante o processo, mas também pelos contaminantes que dão cor ao material extraído, os quais foram eliminados.

**Tabela 7:** Extração de DNA das amostras intestinais de *P. excavatus*.

Método	Região do intestino	Rendimento (ng)	260/280 <sup>1</sup>	260/230 <sup>1</sup>	Cor do precipitado de DNA	PCR <sup>2</sup>	DNA de alta massa molecular
M1 - Power Soil DNA Isolation Kit	Anterior	930	1,84	0,80	incolor	+	-
	Médio	920	1,95	0,88	incolor	+	-
	Posterior	2790	1,77	2,08	incolor	+	-
M2 - QIAmp DNA Stool mini Kit	Anterior	2210	1,75	0,49	incolor	+	-
	Médio	9330	2,15	1,55	incolor	+	-
	Posterior	6450	2,05	1,34	incolor	-	-
M3 - Sagar <i>et al</i> , 2014	Anterior	4490	1,12	0,22	amarelo	+	-
	Médio	11500	1,77	0,58	amarelo	+	-
	Posterior	9640	1,75	1,55	amarelo	+	-
M4 - Karnataka, 2009	Anterior	22295	1,30	0,49	amarelo a marrom	-	-
	Médio	29535	1,39	0,71	amarelo a marrom	-	-
	Posterior	30245	1,75	1,26	amarelo a marrom	+	-
M5 - DNAzol - Invitrogen	Anterior				incolor		-
	Médio				incolor		-
	Posterior				incolor		-
M6 - SDS - este trabaho	Anterior	18800	1,58	0,69	amarelo a marrom	-	-
	Médio	22300	1,68	0,84	amarelo a marrom	+	-
	Posterior	71070	1,96	1,53	amarelo a marrom	+	-
M7a - CTAB e Fenol - este trabalho	Anterior	1130	1,68	1,12	marrom	+	+
	Médio	1740	1,94	1,40	marrom	+	+
	Posterior	5660	1,92	2,03	marrom	+	+
M7b - CTAB e Fenol - este trabalho	Anterior	1170	1,58	0,63	incolor		+
	Médio	3280	1,92	0,65	incolor		+
	Posterior	9680	2,01	1,11	incolor		+

<sup>1</sup>Relação de absorbância, nos comprimentos de onda indicados (em nanômetros), medidos no espectrofotômetro Nanodrop.

<sup>2</sup> Os sinais + e - indicam o resultado para o teste de amplificação parcial do gene 16S rRNA. As amostras extraídas pelo método M5 e M7b não foram testadas para amplificação do gene 16S rRNA.



**Figura 3. DNA total extraído por diferentes protocolos.** Eletroforese de DNA em 0,7% de gel de agarose em tampão TAE a 40 volts durante 3 horas. As letras A, M e P indicam as regiões do intestino anterior, média e posterior, respectivamente. A letra K é referente ao marcador de DNA de 10 kb (Fermentas).  $\Lambda$  Hind é o marcador DNA-Hind III (NEB). **A)** Extração de DNA pelo método M1. **B)** Extração de DNA pelo método M2. **C)** Extração de DNA pelo método M3. **D)** extração de NA pelo método M4. **E)** Extração de DNA pelo método M5. **F)** Extração de DNA pelos métodos M6 e M7a. **G)** Extração de DNA pelo método M7b. O gel foi corado com brometo de etídeo e o DNA foi visualizado sob luz UV. Fonte: autor (2018).

A taxa de rendimento do DNA, contaminação e degradação do DNA nas amostras extraídas variaram dentro de cada método de extração e todos os sete métodos isolaram quantidades consideráveis de DNA com exceção do método M5. Comparando os três métodos comerciais, o método DNAzol foi o que o obteve pior resultado considerando a quase ausência de DNA extraído (Figura 3E). Os métodos M1 e M2 tiveram resultados similares, ambas as extrações tiveram êxito na obtenção de material incolor e tiveram sua relação 260/280 dentro da faixa de um DNA de boa qualidade; indicando assim que o DNA não contém contaminação com proteína e outros interferentes. Todavia, a relação de 260/230 ficou abaixo do recomendado para o padrão de qualidade, a faixa de 230 nm pode indicar contaminação por polissacarídeos e/ou substâncias húmicas (MAIA *et al.*, 2013; SAGAR *et al.*, 2014). Nenhum dos métodos avaliados obteve uma razão igual ou superior a 1.8 para a relação 260/230, nem mesmo o método M2 que possui componentes



para a retirada de polissacarídeos, os quais são comuns em amostras fecais. Tampouco o método M1 que possui componentes para a retirada de compostos húmicos que são comuns em amostras de solo (GUNASEKARAN, 2008; STAUFFER *et al.*, 2008; KARNATAKA, 2009; SAGAR *et al.*, 2014., KAJENDHRAN).

Todos os métodos apresentaram regiões de arraste relativamente claras, com exceção do método M5, indicando degradação do DNA (Figura 2). Apenas o método M7 mostrou moléculas de alto peso (Figura 3F).

**Tabela 8:** Parâmetros de qualidade do DNA das amostras do substrato e dos intestinos de *P. excavatus* e *D. annae*.

Etapas de purificação <sup>1</sup>	Amostra	Concentração (ng/μL)	260/280 <sup>2</sup>	260/230 <sup>2</sup>	Cor do precipitado de DNA
<b>Substrato</b>					
Antes	Substrato - SM1 - SM2 - SM3	4654,80 - 4752,30 - 4926,4	1,48 - 1,49 - 1,50	0,78 - 0,80 - 0,81	Marrom escuro
Depois	Substrato - SM1 - SM2 - SM3	179,10 - 230,80 - 234,40	2,05 - 2,05 - 2,04	1,81 - 1,87 - 1,90	Incolor
<b><i>Perionyx excavatus</i></b>					
Antes	Anterior: EA1 - EA2 - EA3	946,00 - 1124,10 - 802,20	1,67 - 1,59 - 1,57	0,82 - 0,75 - 0,73	Marrom
	Médio: EM1 - EM2 - EM3	1239,10 - 1061,80 - 113,20	1,74 - 1,7 - 1,68	0,94 - 0,90 - 0,89	Marrom
	Posterior: EP1 - EP2 - EP3	1105,50 - 2046,30 - 1414,40	2 - 1,99 - 1,94	1,48 - 1,45 - 1,36	Marrom
	Coprólito: EC1 - EC2 - EC3	492,30 - 384,60 - 467,70	1,39 - 1,35 - 1,37	0,63 - 0,68 - 0,62	Marrom
Depois	Anterior: EA1 - EA2 - EA3	10,70 - 15,60 - 7,10	1,99 - 1,87 - 1,81	1,45 - 1,21 - 1,76	Incolor
	Médio: EM1 - EM2 - EM3	26,10 - 19,40 - 31,80	1,97 - 1,98 - 2,20	1,62 - 1,46 - 1,87	Incolor
	Posterior: EP1 - EP2 - EP3	30,90 - 75,80 - 31,40	1,99 - 1,99 - 2,09	1,89 - 2,07 - 1,65	Incolor
	Coprólito: EC1 - EC2 - EC3	9,20 - 9,70 - 6,40	1,93 - 1,97 - 1,95	1,02 - 1,06 - 0,97	Incolor
<b><i>Dichogaster annae</i></b>					
Antes	Anterior: AA1 - AA2 - AA3	359,70 - 534,30 - 636,40	1,93 - 1,89 - 1,51	0,87 - 1,02 - 1,02	Marrom
	Médio: AM1 - AM2 - AM3	546,80 - 683,20 - 617,20	1,84 - 1,57 - 1,84	1,11 - 1,14 - 1,22	Marrom
	Posterior: AP1 - AP2 - AP3	698,30 - 685,40 - 616,40	1,62 - 1,40 - 1,86	1,20 - 1,09 - 1,28	Marrom
	Coprólito: AC1 - AC2 - AC3	101,00 - 77,60 - 254,60	1,30 - 1,44 - 1,59	0,44 - 0,35 - 1,61	Marrom
Depois	Anterior: AA1 - AA2 - AA3	5,50 - 8,10 - 25,90	2,19 - 1,88 - 2,07	0,75 - 1,08 - 1,71	Incolor
	Médio: AM1 - AM2 - AM3	6,70 - 32,40 - 57,40	2,63 - 1,99 - 2,24	1,09 - 1,79 - 1,99	Incolor
	Posterior: AP1 - AP2 - AP3	50,50 - 51,30 - 53,10	2,17 - 2,10 - 2,14	2,04 - 1,89 - 2,05	Incolor
	Coprólito: AC1 - AC2 - AC3	7,40 - 5,90 - 7,60	1,52 - 1,88 - 1,62	0,98 - 0,93 - 0,92	Incolor

Parâmetros medidos pelo Nanodrop. A tabela mostra o resultado para a triplicata biológica.

<sup>1</sup>A etapa de purificação foi realizada com o kit Power Soil DNA da MoBio (método M7a).

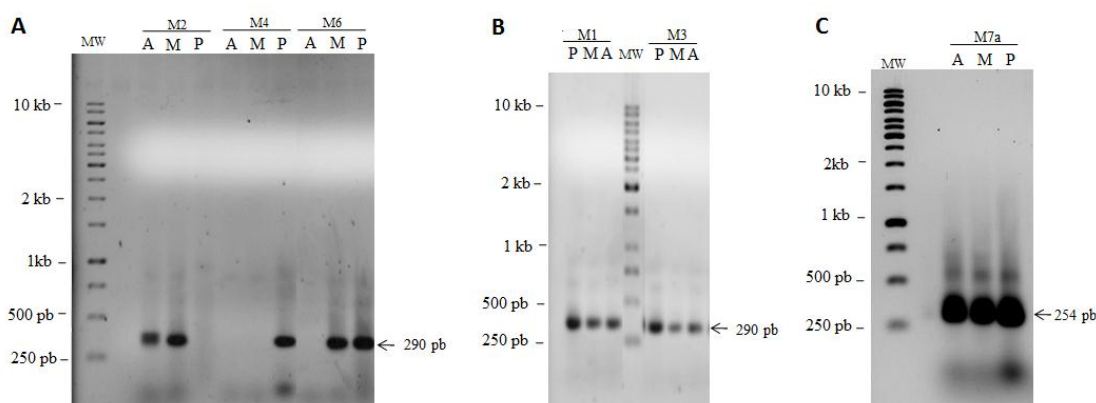
<sup>2</sup>Razão de absorvância, nos comprimentos de ondas indicados (em nanômetros), medidos em espectrofotômetro Nanodrop.

Os parâmetros avaliados pelo Nanodrop assim como os dados obtidos pela eletroforese são importantes para avaliar a qualidade do DNA. No entanto, não são as únicas maneiras; a reação de PCR tem sido uma abordagem adotada para verificar se eventuais contaminantes podem afetar as etapas posteriores necessárias para a análise do material. Sendo assim, o próximo passo foi a amplificação do gene 16S rRNA utilizando-se os *primers* Y1 e Y2 (YOUNG, DOWNER, EARLY., 1999). Para as amostras do método M7a a amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando os *primers* 515F

e 806R. Devido a baixa quantidade de DNA total extraído pelo método M5 não foi realizado o teste para PCR.

O gene 16S rDNA não foi amplificado em todas as 36 amostras de DNA. Somente os métodos M1, M3 e M7a foram bem sucedidos para amplificação de DNA em todas as regiões intestinais de minhoca, indicando que os três métodos isolaram DNA de qualidade suficiente para aplicação de PCR (Figura 4).

Dos métodos comerciais avaliados, o método M1 (Power Soil Kit da MoBio) teve sucesso na amplificação do gene 16S rRNA para todas as regiões do intestino e pode ser usado em projetos que tenham como objetivo a análise de biodiversidade bacteriana através do gene 16S rRNA. Entretanto, nenhum dos métodos comerciais extraiu DNA de alta massa molecular, o qual é necessário para etapas futuras como a construção de bibliotecas metagenômicas e clonagem da proteína de interesse após a prospecção *in silico*. Portanto, dos métodos comerciais avaliados nenhum seria recomendado para análise metagenômica com interesse de buscar enzimas de interesse biotecnológico.



**Figura 4: Amplificação parcial do gene 16S rRNA.** Electroforese de DNA em gel de agarose a 1% em tampão TAE a 80 volts durante 1 h. As letras A, M e P indicam as regiões do intestino anterior, médio e posterior, respectivamente. As letras MW indicam o marcador de DNA de 10 kb DNA ladder (Fermentas). **A)** Amplificação do gene 16S rRNA de amostras de intestino de minhoca pelos métodos de extração de M2, M4 e M5. **B)** Amplificação do gene 16S rRNA de amostras de intestino de minhoca por métodos de extração M1 e M3. **C)** Amplificação do gene 16S rRNA de amostras de intestino de minhocas pelo método de extração M7a. As setas indicam o produto amplificado. O gel foi corado com brometo de etídeo e o DNA foi visualizado sob luz UV. Fonte: autor (2018).

De todos os métodos de extração de DNA manual apenas os métodos M3 e M7 tiveram êxito na amplificação do gene 16S rRNA para todas as regiões do intestino da minhoca, portanto ambos os métodos podem ser usados em estudos que tenham o objetivo de estudar biodiversidade bacteriana através do gene 16S rRNA. No entanto, para estudos de prospecção *in silico* e expressão de proteínas recomenda-se apenas o

método M7 uma vez que foi o único que teve sucesso para a extração de DNA de alta massa molecular (Figura 3F).

Quase todos os métodos de extração manual resultaram em material colorido, o único método que teve êxito em obter material sem coloração foi o método M7b. Este resultado sugere que a etapa de centrifugação diferencial foi o responsável pelo sucesso da amostra extraída incolor. A vantagem dessa mudança no método M7 é o não uso do kit Power Soil para purificar o DNA, tornando-o consequentemente de menor custo. Na questão de rendimento a mudança não ocasionou grande diferença, como pode ser observado na Tabela 10: cada região do intestino teve rendimento similar tanto no método M7a quanto M7b. No entanto, a etapa de centrifugação diferencial pode ocasionar a perda de alguns tipos bacterianos que, eventualmente, podem estar ligados aos agregados do conteúdo intestinal da minhoca, neste ponto o método M7a apesar de mais caro possui a vantagem de não sofrer o risco de perder parte da biodiversidade a ser analisada. Além disso, as razões de absorbância do método M7a foram melhores do que quando comparada ao método M7b.

O sucesso do método M7 pode ser devido ao uso combinado de CTAB e fenol na etapa de lise celular, tornando essa etapa mais agressiva quando comparada aos demais métodos. O fenol é um solvente hidrofóbico que provoca o rompimento da membrana plasmática e desnaturação de proteínas (ISKEN, BONT, 1998; SEGURA *et al.*, 2012) auxiliando assim na lise celular e na desnaturação das proteínas. O CTAB é usado na purificação de ácido nucléico a partir de organismos que produzem grandes quantidades de polissacarídeos, tais como plantas e algumas bactérias gram-positivas (TAN, YIAP, 2009), sendo assim o uso do CTAB na extração das amostras no presente trabalho pode ter sido um fator determinante uma vez que durante o processo de digestão da minhoca é liberado uma grande quantidade de muco. Na presença deste detergente os ácidos nucleicos e os polissacarídeos possuem solubilidades diferentes (ROMERO BRASILEIRO, 1999). Além disso, o CTAB participa da dissolução da membrana celular participando assim da lise celular (WEISING *et al.*, 1995). Além disso, o CTAB assim como PVPP auxiliam na remoção de materiais húmicos (ZHOU, BRUNS, TIEDJE, 1996).

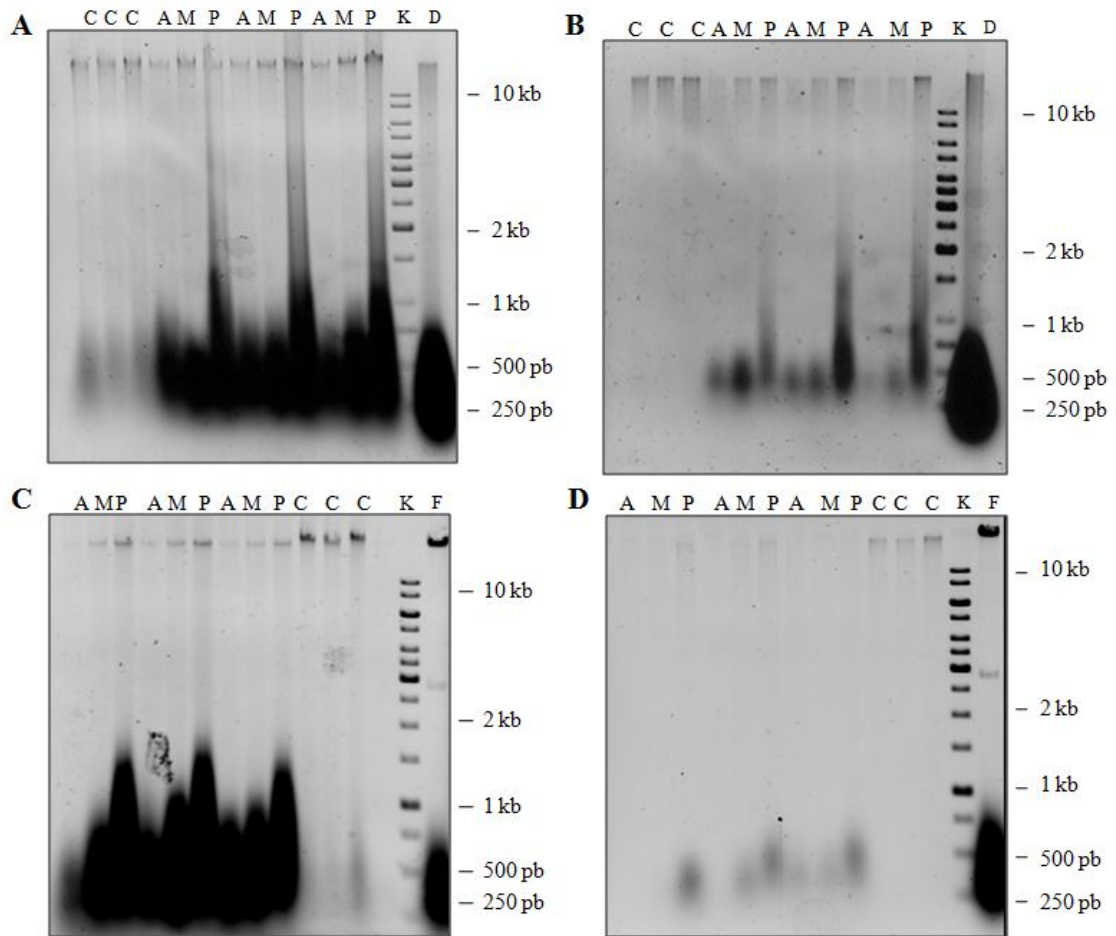
A literatura disponibiliza uma vasta opção de protocolos para a etapa de lise celular, tendo varias opções de técnicas de lise mecânica assim como diversos compostos para a lise química. Na maioria dos casos é usada uma combinação das técnicas e

substâncias a fim de melhorar a qualidade e o rendimento da extração de DNA. As propriedades físicas e químicas das amostras vão desempenhar um papel central na eficiência da extração do DNA assim como a composição da comunidade bacteriana presente. Estudos apontam que diferentes solos com diferentes características apresentam resultados diferentes para o rendimento de DNA frente ao uso do mesmo protocolo de purificação de DNA, assim como uma maior quantidade de bactérias gram-positivas (PICARD *et al.*, 1992; ZHOU, BRUNS, TIEDJE, 1996; TAN, YIAP, 2009). Sendo assim, os componentes do tampão de lise e também o uso de lise mecânica podem ter sido os fatores chaves para a extração de DNA do conteúdo intestinal de minhoca.

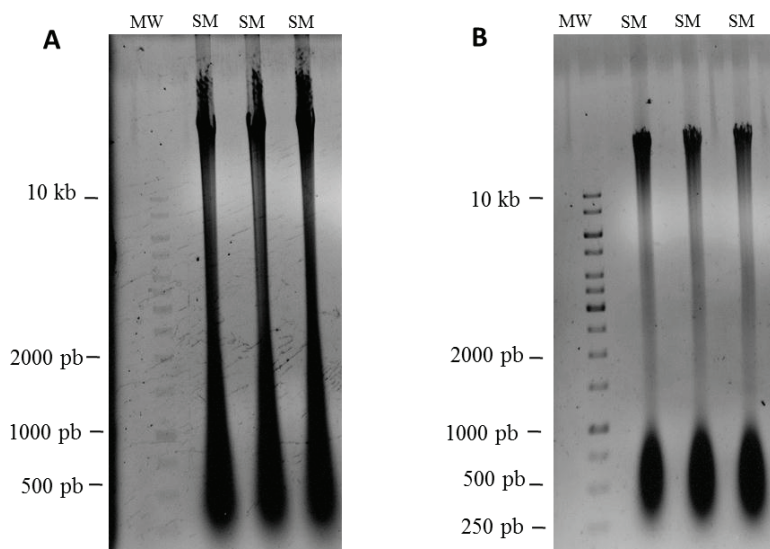
O método M7 foi o escolhido para a extração de DNA porque foi o único que resultou na obtenção de DNA com alta massa molecular. O método M7a foi utilizado para as extrações de DNA destinadas a análise de biodiversidade através do gene 16S rRNA. O resultado da extração do DNA das triplicatas biológicas de ambas as espécies de minhocas se encontra na Figura 5. O resultado da extração do DNA das triplicatas biológicas do substrato é apresentado na Figura 6.

O método M7b foi usado para a construção das bibliotecas destinadas ao sequenciamento genômico global de DNA. O resultado das extrações de DNA para ambas as espécies de minhoca encontra-se na Figura 7.

As amostras utilizadas para a montagem das bibliotecas para o sequenciamento foram quantificadas pelo sistema do Nanodrop para a obtenção das razões de absorbância de A260/A280 e A260/A230 que foram usadas para determinar a contaminação de proteína e de compostos polifenólicos e polissacarídicos, respectivamente. As medidas encontradas usando o Nanodrop costumam ser superestimadas e a medida correta de concentração de DNA é de suma importância para o preparo das amostras para o sequenciamento de nova geração. O sistema Qubit possui uma precisão melhor para a obtenção da concentração certa das amostras com baixa concentração de DNA porque o corante do Kit do Qubit liga-se somente em dsDNA (do inglês, “double-stranded” DNA, DNA de dupla fita). A concentração das amostras foi estimada pelos dois sistemas. A quantificação realizada pelo Qubit é apresentada nas Tabelas 9 e 10.



**Figura 5: Eletroforese de DNA extraído pelo método M7a de amostras de intestino e coprólito de minhocas das espécies *P. excavatus* e *D. annae*.** As letras A, M e P são referentes às regiões do intestino anterior, médio e posterior, respectivamente. A letra C é referente à amostra de coprólito. A letra K é referente marcador 10 kb DNA ladder (Fermentas). **A)** DNA extraído de *P. excavatus*. **B)** DNA extraído de *P. excavatus* e purificado usando-se o Power Soil DNA Isolation Kit (MO-Bio Kit). **C)** DNA extraído de *D. annae*. F indica o fosmídeo MAF após restrição com as enzimas *MAF* e *XbaI* usado como controle durante a eletroforese. **D)** DNA extraído de *D. annae* e purificado usando-se o Power Soil DNA Isolation Kit (MO-Bio Kit). F indica o fosmídeo MAF após restrição com as enzimas *MAF* e *XbaI* usado como controle durante a eletroforese. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida pelo sistema de fotodocumentação UVP. Tampão TAE 1X em gel de agarose 0,7%. Fonte: autor (2018).



**Figura 6: Eletroforese de DNA extraído pelo método M7a das amostras de substrato.** As letras SM são referentes a substrato e as MW são referentes ao marcador 10 kb DNA ladder (Fermentas). A figura mostra a extração das triplicatas. **A)** DNA extraído de substrato. **B)** DNA extraído de substrato e purificado pelo kit Power Soil DNA da MoBio. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida pelo sistema de fotodocumentação UVP. Tampão TAE 1X em gel de agarose 0,7%. Fonte: autor (2018).

**Tabela 09:** Quantificação Qubit. Extração realizada pelo método M7a para a análise de biodiversidade através do gene 16S rRNA.

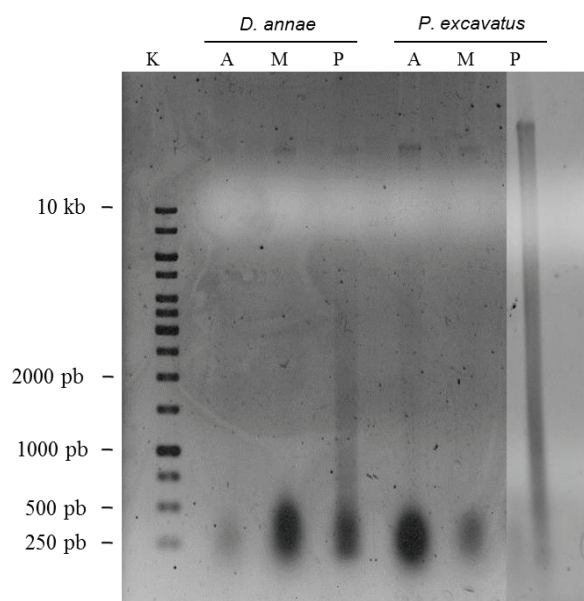
Amostra	Concentração (ng/μL) <sup>1</sup>
<b>Substrato</b>	
SM1 - SM2 - SM3	44,60 - 48,60 - 51,00
<b><i>P. excavatus</i></b>	
Anterior: EA1 - EA2 - EA3	1,50 - 1,10 - 0,70
Médio: EM1 - EM2 - EM3	2,00 - 1,40 - 1,70
Posterior: EP1 - EP2 - EP3	1,80 - 1,50 - 3,00
Coprólito: EC1 - EC2 - EC3	3,70 - 4,00 - 3,00
<b><i>D. annae</i></b>	
Anterior: AA1 - AA2 - AA3	0,40 - 0,40 - 1,20
Médio: AM1 - AM2 - AM3	0,50 - 1,00 - 2,20
Posterior: AP1 - AP2 - AP3	2,80 - 2,40 - 2,00
Coprólito: AC1 - AC2 - AC3	0,50 - 0,50 - 2,00

<sup>1</sup>Quantificação de DNA pelo Qubit no sistema Qubit™ dsDNA HS (High Sensitivity) após a etapa de purificação usando o kit Power Soil DNA da MoBio.

**Tabela 10:** Quantificação Qubit. Extração realizada pelo método M7b para sequenciamento global e anotação funcional.

Amostra	Concentração (ng/μL)	Amostra	Concentração (ng/μL)
<i>P. excavatus</i>		<i>D. annae</i>	
Anterior + Médio	9,0	Anterior + Médio	10,4
Posterior	37,8	Posterior	7,0

Quantificação de DNA pelo Qubit no sistema Qubit™ dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit das amostras das minhocas *P. excavatus* e *D. annae*.



**Figura 7:** Eletroforese de DNA extraído pelo método M7b das amostras de intestino das minhocas das espécies *P. excavatus* e *D. annae*. As letras A, M e P são referentes às regiões do intestino anterior, médio e posterior, respectivamente. A letra K é referente marcador 10 kb DNA ladder (Fermentas). O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida pelo sistema de fotodocumentação UVP. Tampão TAE 1X em gel de agarose 0,7%. Fonte: autor (2018).

## 5.2 Análise de Biodiversidade por amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

O DNA extraído e purificado foi utilizado para a amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA utilizando a plataforma Illumina MiSeq. Foi obtido um total de 1.030.004 sequências (*reads*) pertencentes às diferentes amostras. A média das curvas de rarefação de cada triplicata biológica (Figura 8) resultante mostra curvas íngremes a direita, o que indica que a amostragem e o sequenciamento foram responsáveis por uma cobertura parcial das espécies que compõe o ambiente. As curvas revelam diferença na riqueza estimada das comunidades bacterianas das amostras. Os números totais de *reads* de cada amostra, assim como número de OTUs encontradas, usando como número de

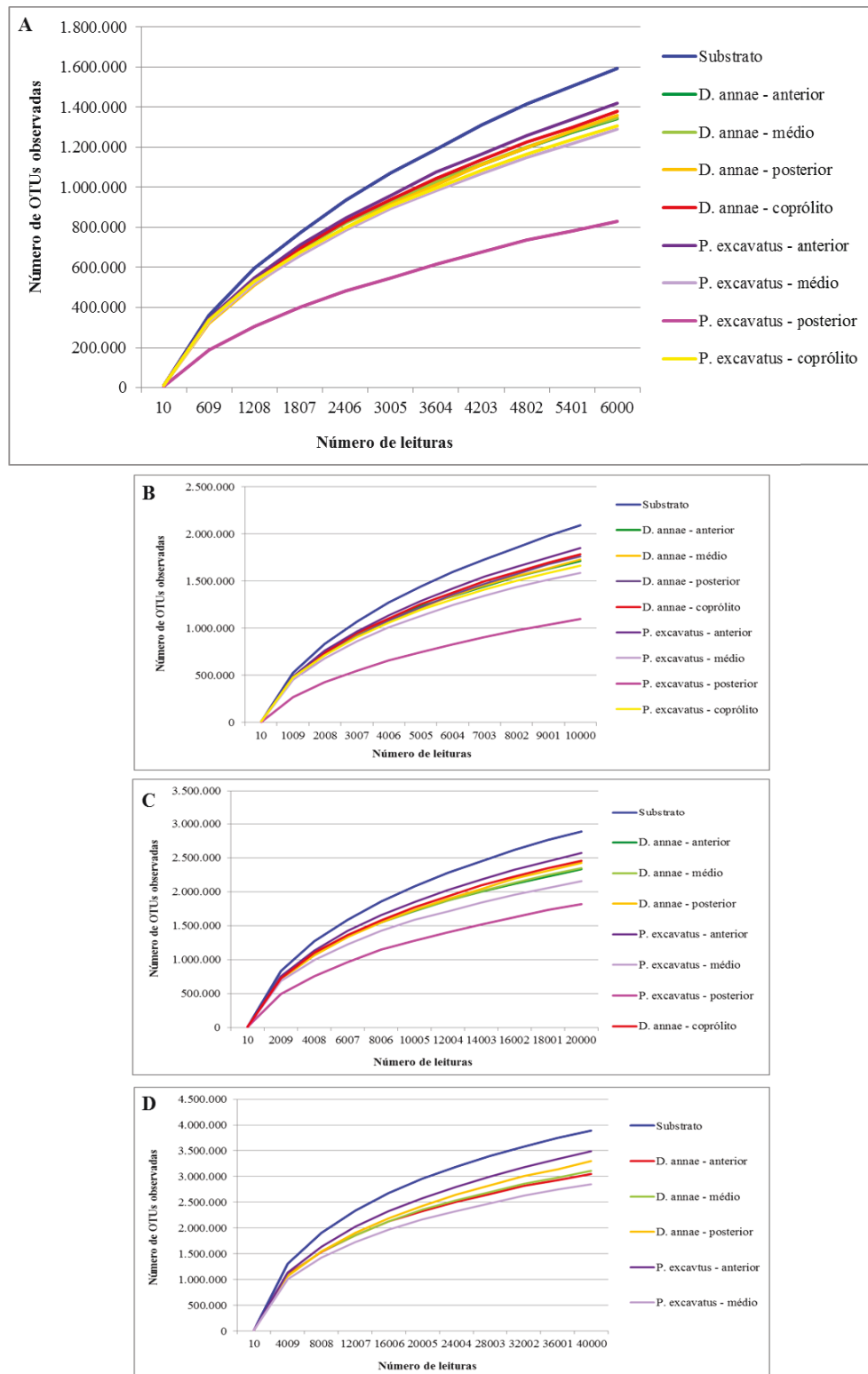
corte de 6.000 *reads* para amostragem e análise são apresentados na Tabela 11. As amostras 1EP, 2EP e 3EP, referentes à triplicata biológica da região posterior de *P. excavatus*, apresentaram a menor diversidade. Enquanto que as amostras SM1, SM2 e SM3, referentes à triplicata biológica do substrato, foram as que apresentaram maior diversidade.

**Tabela 11:** Total de sequências obtidas a partir do sequenciamento de DNA para análise de biodiversidade e OTU das amostras.

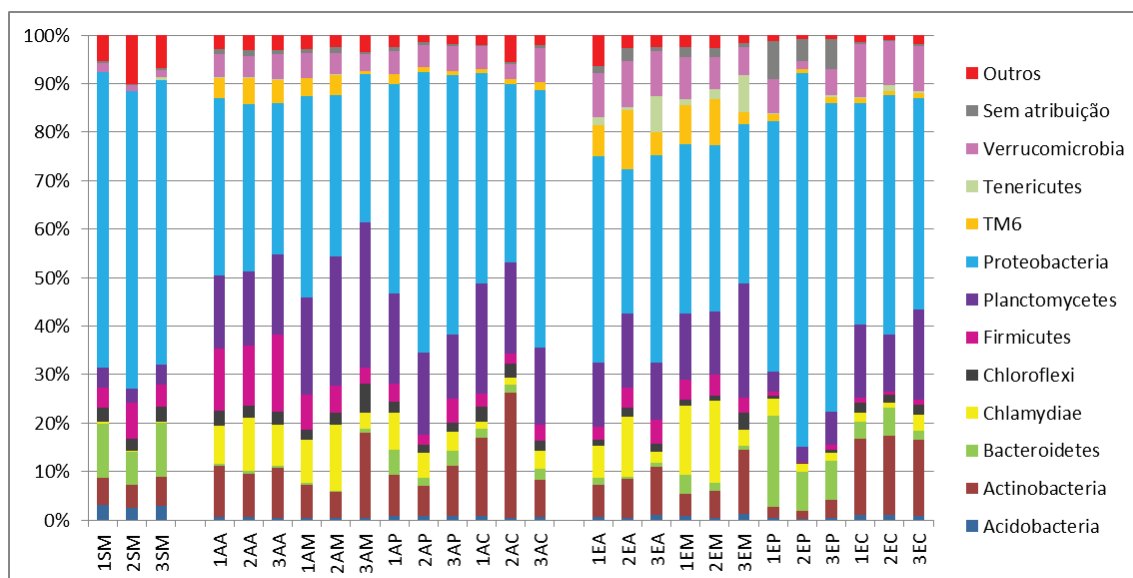
Amostra	<i>Perionyx excavatus</i>									
	Número de <i>reads</i>					OTU				
	réplica 1	réplica 2	réplica 3	média	DP*	réplica 1	réplica 2	réplica 3	média	DP*
EA	93378	43267	58430	65025	25698	1385	1424	1440	1416	28
EM	56307	14151	8152	26203	26243	1232	1247	1377	1285	80
EP	18292	18199	23907	20133	3269	845	683	962	830	140
EC	12220	13304	17073	14199	2547	1257	1215	1430	1301	114
Amostra	<i>Dichogaster annae</i>									
	Número de <i>reads</i>					OTU				
	réplica 1	réplica 2	réplica 3	média	DP*	réplica 1	réplica 2	réplica 3	média	DP*
AA	16259	23632	45478	28456	15195	1335	1353	1338	1342	10
AM	26319	45248	6636	26068	19307	1345	1336	1358	1346	11
AP	303301	71026	20504	131610	150819	1401	1249	1400	1350	87
AC	34139	12156	23209	23168	10992	1402	1394	1328	1375	41
Amostra	<i>Substrato</i>									
	Número de <i>reads</i>					OTU				
	réplica 1	réplica 2	réplica 3	média	DP*	réplica 1	réplica 2	réplica 3	média	DP*
SM	50427	41545	37250	43074	6720	1649	1490	1657	1599	94

As amostras são indicadas pelas letras E ou A para *P. excavatus* e *D. annae*, respectivamente, seguidas das letras A, M, P ou C para o intestino anterior, intestino médio, intestino posterior e coprólogo, respectivamente. A amostra de substrato usada para alimentação de minhoca é indicada como SM. OTU corresponde a uma linha de corte de 6000 leituras. OTU: Unidade Taxonômica Operacional (do inglês *Operational Taxonomic Units*) As OTUs foram definidas usando 97% de similaridade. \*DP: desvio padrão.



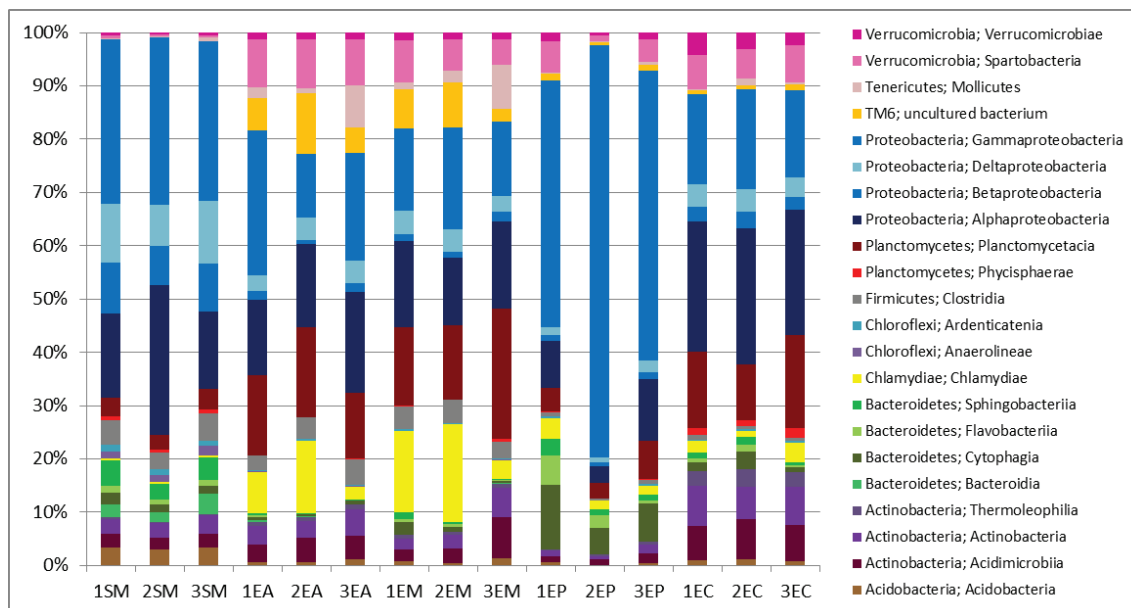


**Figura 8: Curvas de rarefação.** As curvas de rarefação indicam a média das curvas de rarefação da triplicata biológica de cada região do intestino da minhoca e do coprólito. **A)** OTU corresponde a uma linha de corte de 6000 leituras. **B)** OTU corresponde a uma linha de corte de 10000 leituras. **C)** OTU corresponde a uma linha de corte de 20000 leituras. **D)** OTU corresponde a uma linha de corte de 40000 leituras. OTU: Unidade Taxonômica Operacional (do inglês *Operational Taxonomic Units*). As OTUs foram definidas usando 97% de similaridade. Dados obtidos do QIIME 1.9.1. Fonte: autor (2018).

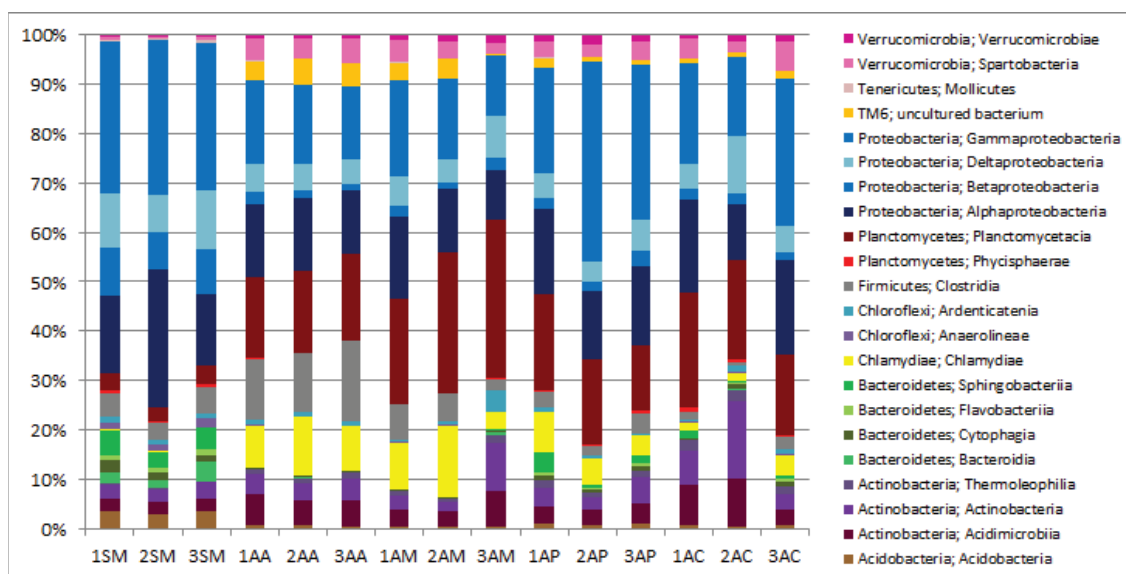


**Figura 9: Composição da comunidade microbiana do substrato, intestino e coprólito ao nível de filo observada para as duas espécies de minhoca.** O gráfico representa os filos mais abundantes ( $\geq 1\%$ ) que compõem as amostras. Sem atribuição representa a porcentagem das sequências que não receberam atribuição taxonômica. “Outros” representa a porcentagem dos filos menos abundantes. A análise de avaliação taxonômica de 16S rRNA foram extraídos do servidor QIIME 1.9.1. As siglas AA, AM, AP e AC representam as amostras região anterior, média, posterior do intestino e o coprólito de *D. annae*, respectivamente. As siglas EA, EM, EP e EC representam as amostras região anterior, média, posterior do intestino e o coprólito de *P. excavatus*, respectivamente. A sigla SM a amostra do substrato. Fonte: autor (2018).

A composição da comunidade bacteriana das amostras para os grupos considerados mais abundantes ( $\geq 1\%$ ), no nível de filo e classe, mostra uma flutuação na abundância relativa desses grupos conforme o substrato passa pelo trato digestório das minhocas e se torna coprólito (Figuras 9, 10 e 11). A comunidade bacteriana do substrato e da região posterior mostrou possuir mais OTUs do filo de Proteobacteria do que as da região anterior e média em ambas as espécies de minhoca (Figuras 9, 12 e 13). O filo Chloroflexi tem a abundância diminuída gradativamente conforme passa pelo trato digestório de *P. excavatus* (Figuras 9 e 12). O filo Bacteroidetes tem maior abundância na região posterior de *P. excavatus* (Figuras 9 e 12), sendo que a classe que maior contribui para essa diferenciação é Cytophagia (Figuras 10 e 14). O substrato quando comparado às amostras de *D. annae* possui um número maior de OTUs de Bacteroidetes (Figuras 9 e 13). As classes Bacteridia e Sphingobacteriia apresentam maior abundância na comunidade bacteriana do substrato, porém a classe Sphingobacteriia tem abundância semelhante na região posterior de ambas as espécies de minhoca (Figuras 10, 11 e 14).



**Figura 10: Composição da comunidade microbiana do substrato, intestino e coprólito da minhoca *P. excavatus* ao nível de Classe.** A análise de avaliação taxonômica de 16S rRNA foram extraídos do servidor QIIME 1.9.1. As siglas EA, EM, EP e EC representam as amostras região anterior, média, posterior do intestino e o coprólito de *P. excavatus*, respectivamente. A sigla SM a amostra do substrato. Fonte: autor (2018).



**Figura 11: Composição da comunidade microbiana do substrato, intestino e coprólito da minhoca *D. annae* ao nível de Classe.** A análise de avaliação taxonômica de 16S rRNA foram extraídos do servidor QIIME 1.9.1. As siglas AA, AM, AP e AC representam as amostras região anterior, média, posterior do intestino e o coprólito de *D. annae*, respectivamente. A sigla SM a amostra do substrato. Fonte: autor (2018).

Na *P. excavatus*, o filo Firmicutes tem uma pequena queda na sua representatividade nas regiões anterior e média quando comparada com a comunidade bacteriana do substrato, porém essa diminuição não é significativa ao contrário do que acontece na região posterior e no coprólito. Na *D. annae*, o mesmo filo tem um aumento

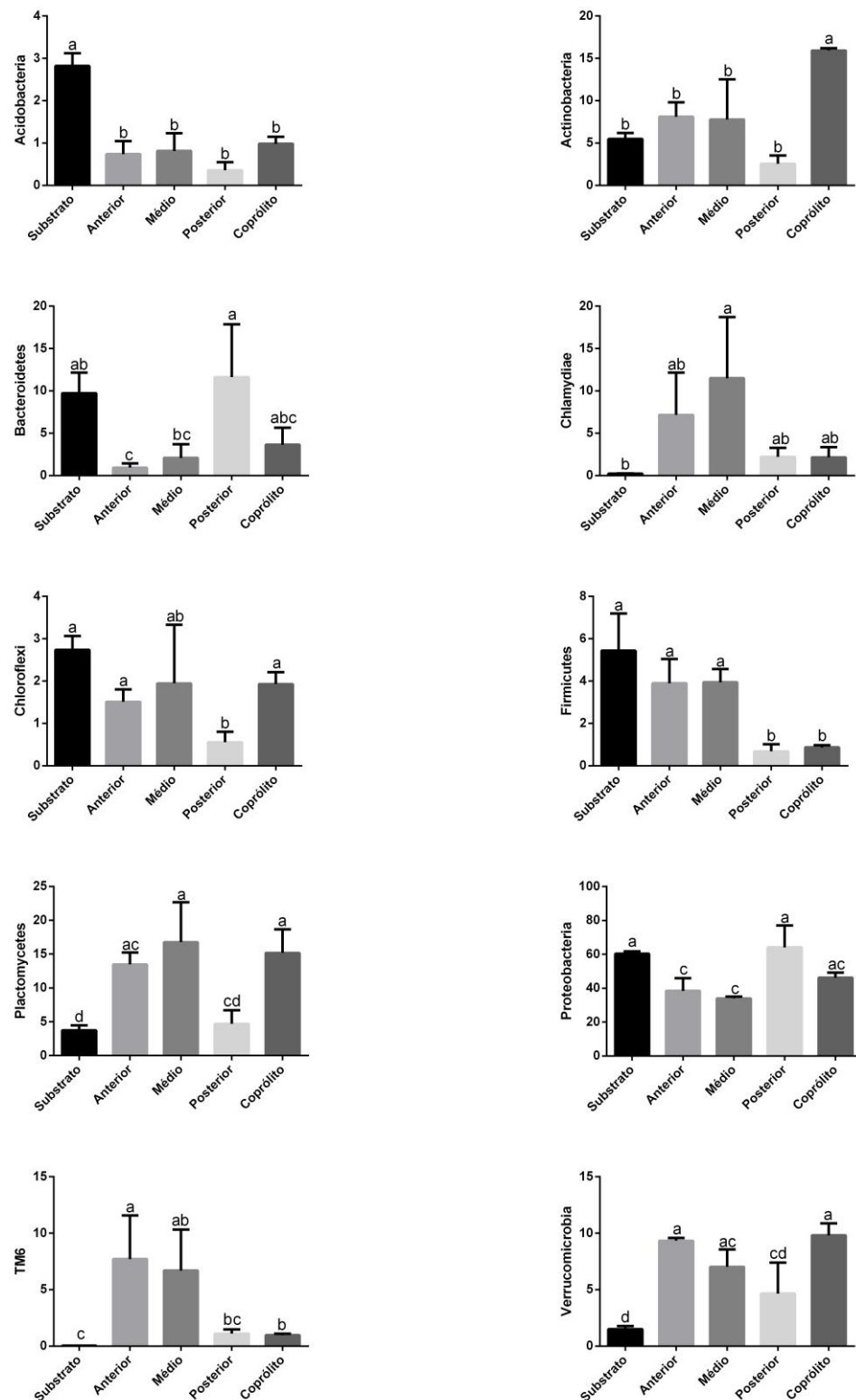
significativo na região anterior quando comparada com as demais partes do intestino. Nas regiões anterior e média de ambas as espécies de minhoca as comunidades bacterianas mostram uma abundância maior dos filos Chlamydiae e TM6 (Figuras 9, 12 e 13) que na região posterior e no coprólito. A comunidade bacteriana do coprólito de *P. excavatus* possui um alto número de OTUs do filo Actinobacteria (Figuras 9 e 12). O filo Verrucomicrobia tem maior presença nas amostras das minhocas que no substrato (Figuras 9, 12 e 13).

Foi construído um *heatmap* com o objetivo de visualizar a densidade relativa de todos os 42 filos encontrados nas amostras e assim poder identificar padrões e locais de concentração elevada ou baixa de forma rápida. Alguns filos, como Chlamydiae, TM7 e TM6, possuem uma pequena abundância na comunidade bacteriana do substrato, sendo que em alguns casos chega a ser quase nula a presença do filo, como o TM6 (Figura 15). Em contrapartida, nas amostras pertencentes às minhocas muitos filos ou não aparecem ou possuem uma abundância muito baixa quando comparadas com o substrato como Armatimonadetes, OD1, Spirochaetae e Synergistetes (Figura 15), sendo que esses filos pertencem aos grupos considerados menos abundantes (< 1%). Apesar do grande número de filos compartilhados isto não implica que a composição das comunidades bacterianas seja similar como mostram as análises de *network* e  $\beta$ -diversidade a seguir.

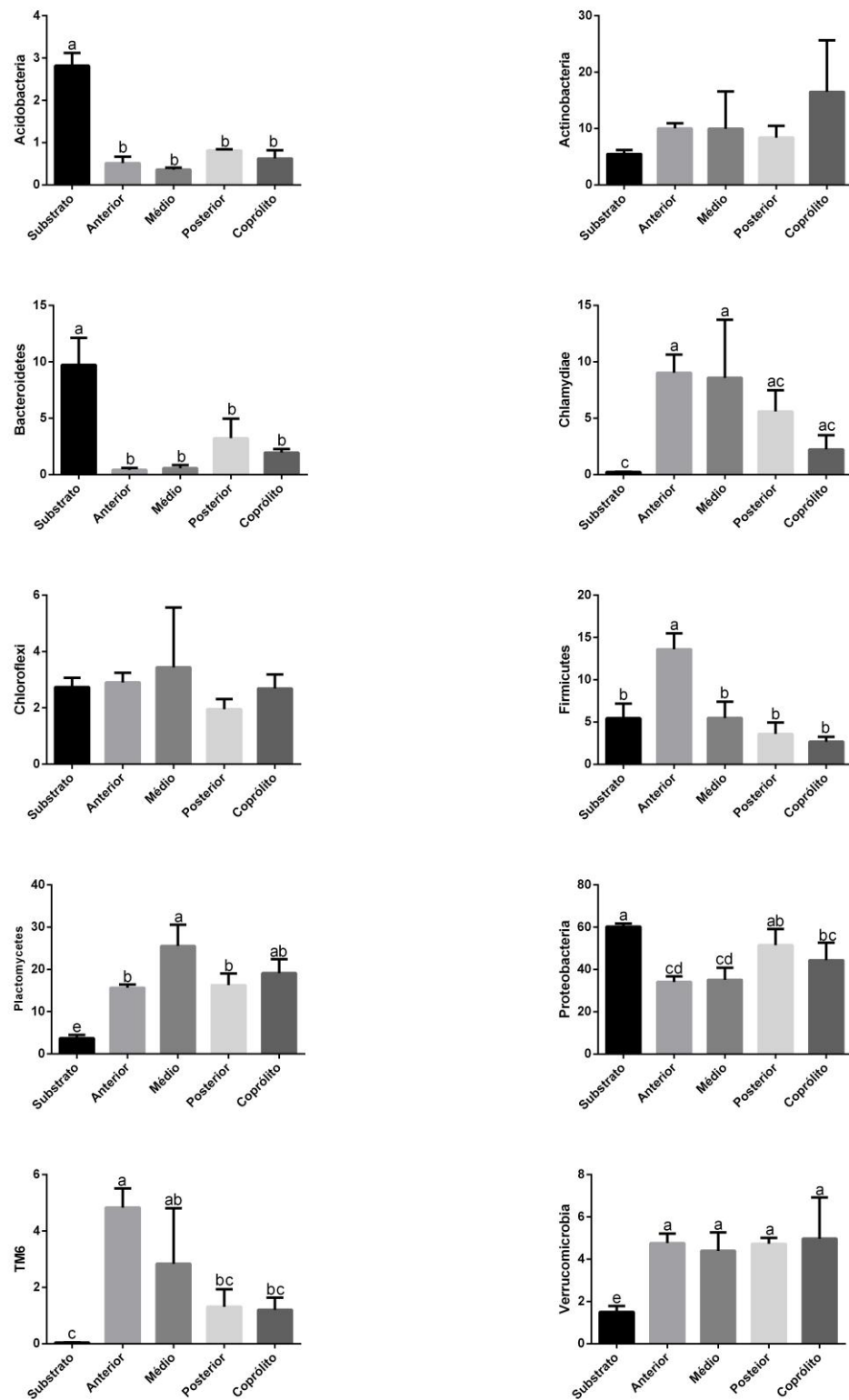
Para visualizar como as OTUs a nível de gênero estavam distribuídas entre as amostras foi realizado uma análise de rede (“*network*”) para cada uma das espécies de minhoca comparando com o substrato (Figura 16) e comparando entre as duas espécies de minhocas (Figura 17). Esta análise mostra e enfatiza as similaridades e diferenças entre as amostras, no diagrama da *network* há dois nós, o nó referente a OTU e o nó referente a amostra, se a OTU é encontrada dentro da amostra os nós são conectados com uma linha. O peso das linhas é definido como o número de sequências em uma OTU. Um teste G para independência é usado para testar se os nós das amostras dentro de categorias estão mais conectados dentro de um grupo do que o esperado por acaso. A clusterização das OTUs é realizada através do algoritmo estocástico “*spring-embedded*”. Os dados mostram que um grande número de gêneros que ocorrem nas amostras do substrato não aparecem nas amostras das minhocas e cada região do intestino da minhoca, assim como o coprólito, possuem uma fração de gêneros sem co-ocorrência (Figura 16). A análise de “*network*” também foi realizada comparando as amostras pertencentes a *P. excavatus* e *D. annae* (Figura 17). Nesta análise é possível verificar uma grande diferença entre as

amostras, evidenciando que apesar de ambas as minhocas causarem efeito similar sobre a composição bacteriana do substrato diminuindo a abundância de alguns filos (Figura 8), o efeito ao nível de gênero é influenciado pela espécie de minhoca.

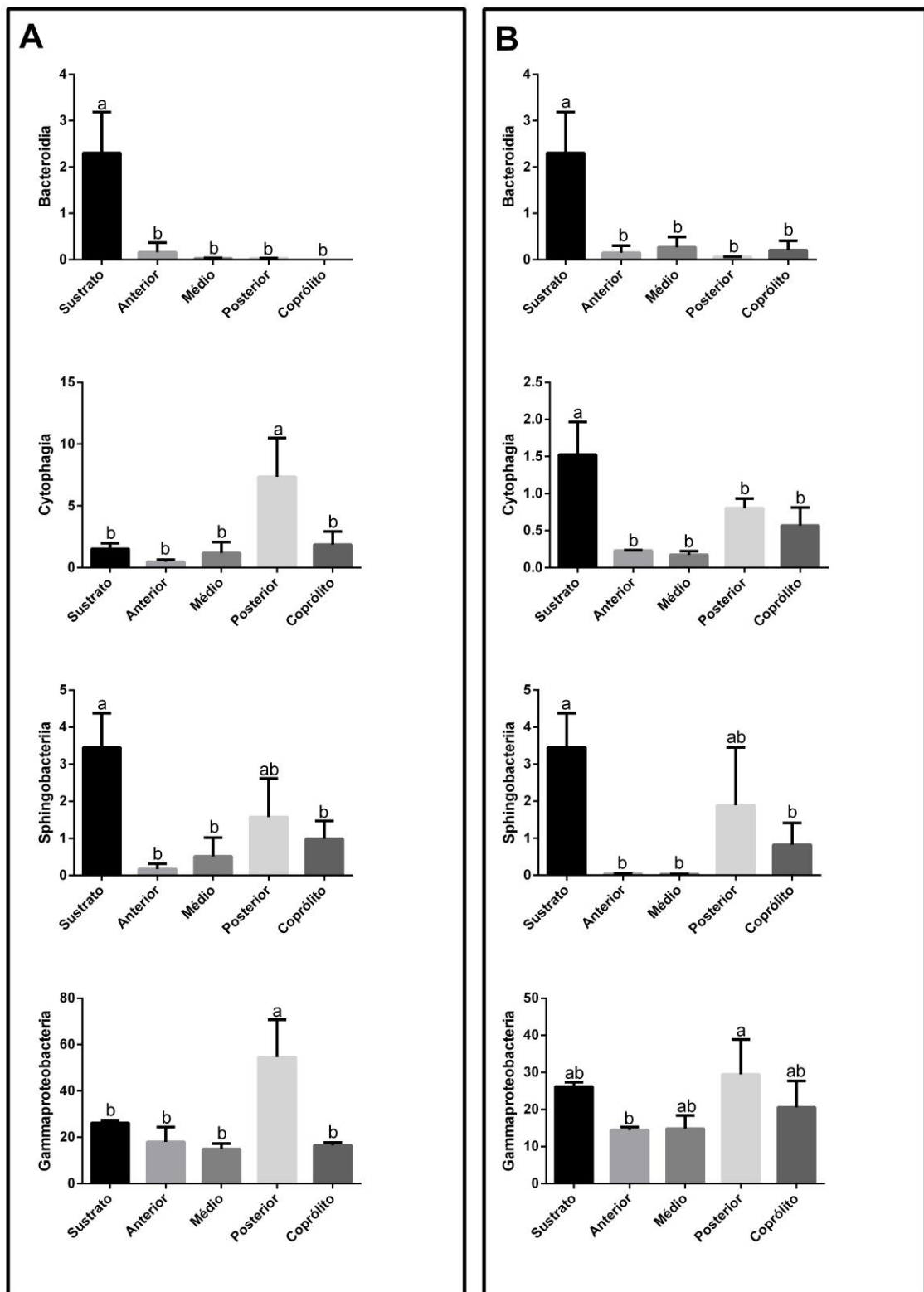
As análises de  $\beta$ -diversidade mostram que a comunidade bacteriana tem diferença na composição taxonômica e filogenética, tanto considerando a presença/ausência de cada OTU (Qualitativo, Figura 18A) quanto considerando a abundância de cada uma (Quantitativo, Figura 18B). As amostras do substrato formam um grupo a parte das demais em ambas as análises de  $\beta$ -diversidade, evidenciando uma diferenciação da comunidade microbiana nessas amostras tanto em relação à diversidade quanto a abundância das OTUs. As amostras das regiões anterior e média são mais próximas entre si, enquanto que a amostra da região posterior é similar ao coprólito. No entanto, quando o fator quantitativo é levado em consideração as amostras da região posterior de *P. excavatus* se distancia das demais amostras e esta separação provavelmente se deve a família *Enterobacteriales* (Gamaproteobacteria, Proteobacteria), a qual possui uma alta abundância relativa nestas amostras.



**Figura 12: Diferenças na abundância relativa de filos bacterianos das comunidades do substrato e das amostras pertencentes a *P. excavatus*.** Diferença entre as amostras (ANOVA seguido de teste de Tukey) estão marcados com diferentes letras,  $p < 0,05$ . A abundância relativa corresponde aos valores do gráfico geral (Figura 8). Fonte: autor (2018).

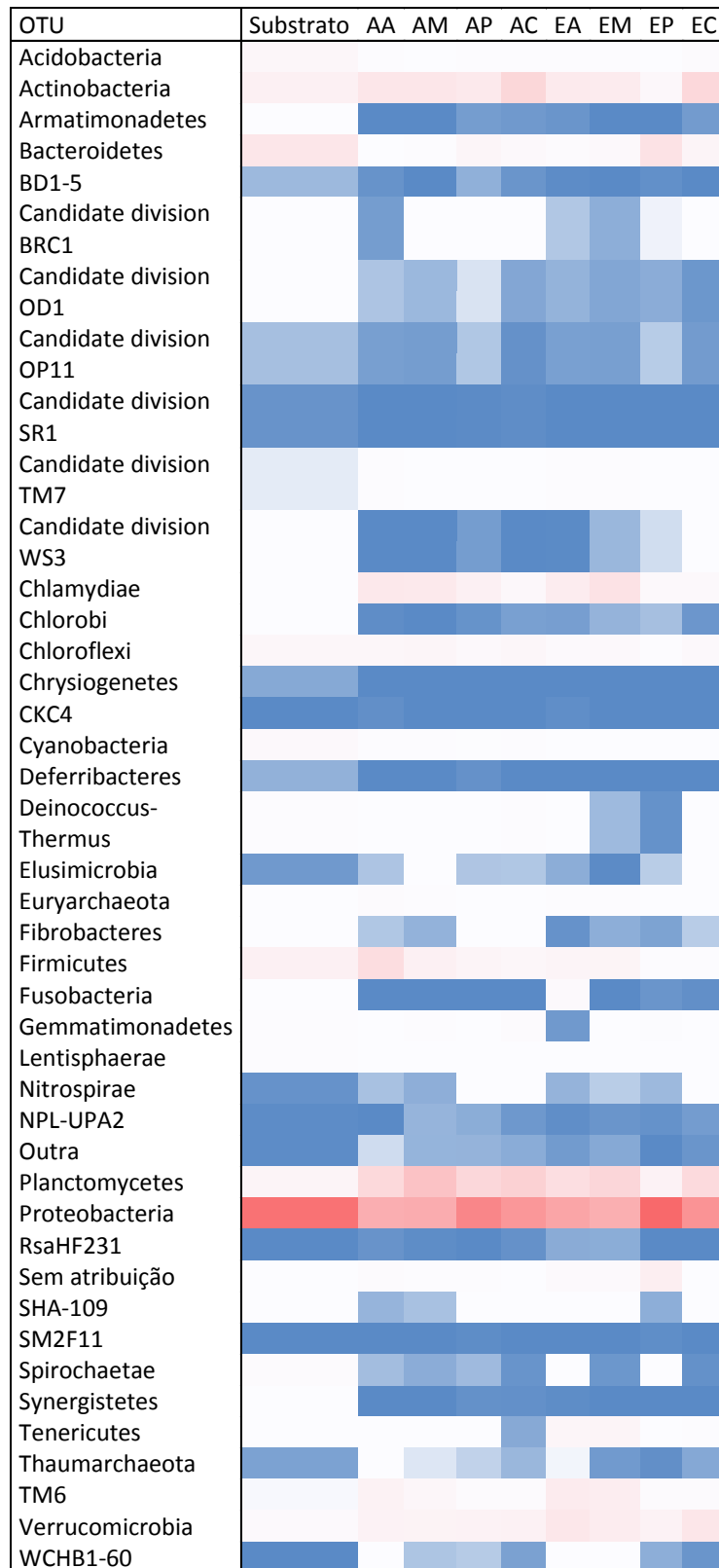


**Figura 13: Diferenças na abundância relativa de filos bacterianos das comunidades do substrato e das amostras pertencentes a *D. annae*.** Diferença entre as amostras (ANOVA seguido de teste de Tukey) estão marcados com diferentes letras,  $p < 0,05$ . A abundância relativa corresponde aos valores do gráfico geral (Figura 8). Fonte: autor (2018).

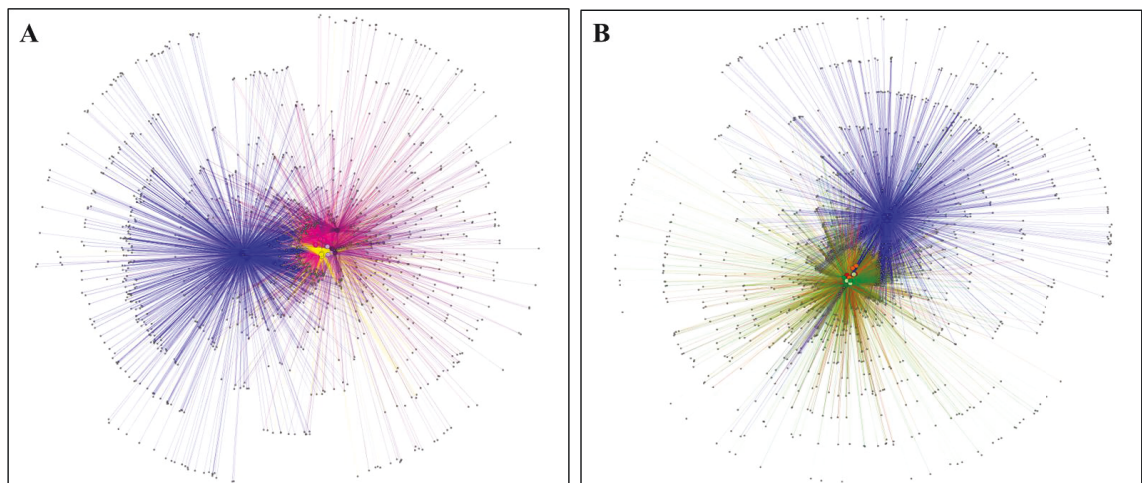


**Figura 14: Diferenças na abundância relativa das classes bacterianas das microbiotas do substrato, do conteúdo intestinal das minhocas e dos coprólitos. A) Amostras pertencentes a *P. excavatus*. B) Amostras pertencentes a *D. annae*. As diferenças (ANOVA seguido de Tukey) estão marcadas com diferentes letras,  $p < 0,05$ . A abundância relativa corresponde aos valores do gráfico geral (Figura 8). Fonte: autor (2018).**

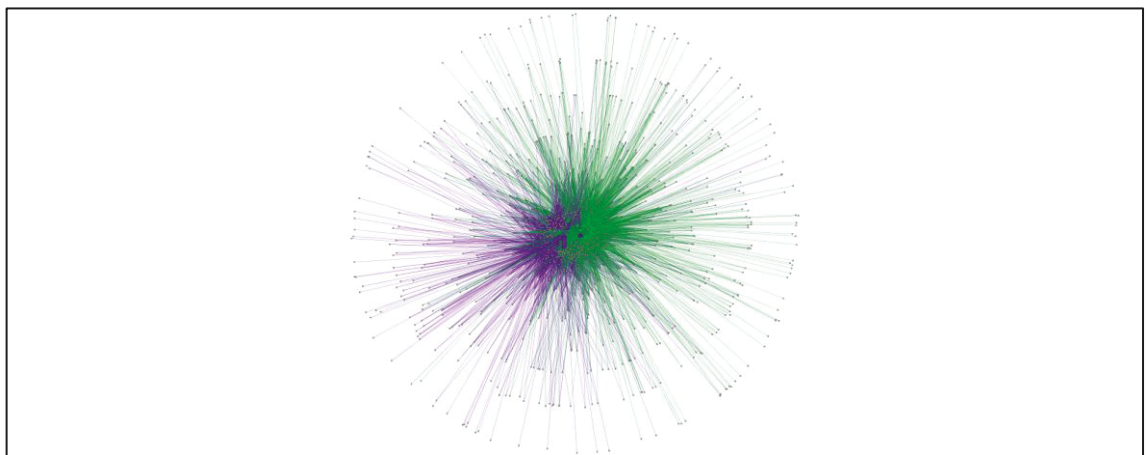




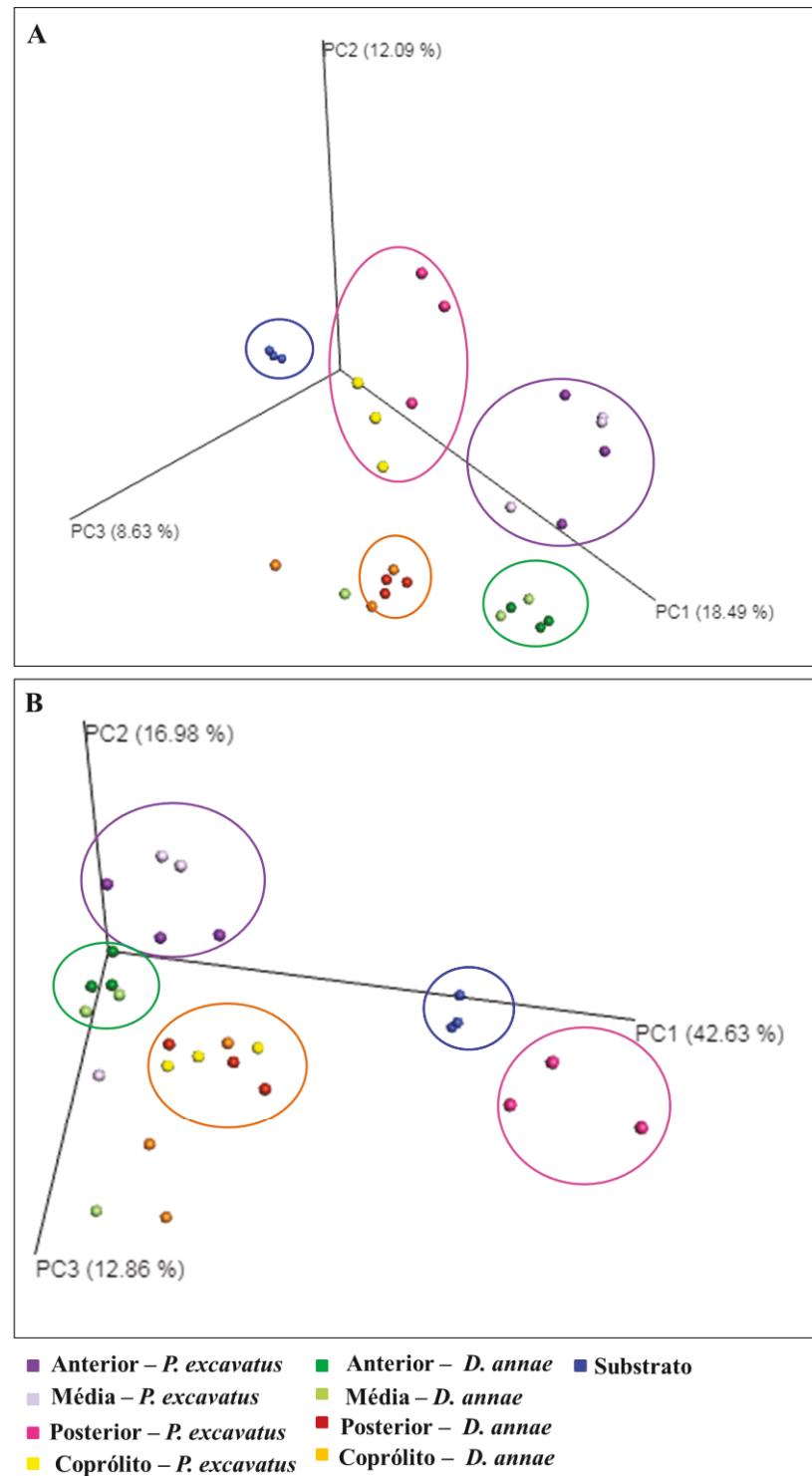
**Figura 15: Heatmap** indicando a densidade relativa para cada filo de bactéria e arquea em cada amostra. A coloração azul representa os menores valores e a coloração vermelha representa os valores mais elevados. As siglas AA, AM, AP e AC indicam as regiões anterior, média, posterior e o coprólito de *Dichogaster annae*, respectivamente. As siglas EA, EM, EP e EC indicam as regiões anterior, média, posterior e o coprólito de *Perionyx excavatus*, respectivamente. Fonte: autor (2018).



**Figura 16: Network de OTUs, em nível de gênero, das comunidades bacterianas.** **A)** Network referente às amostras do substrato (azul) e das pertencentes *P. excavatus*. Região anterior (roxo), região média (lilás), região posterior (rosa) e casts (verde). Os pequenos círculos brancos representam as OTUs. **B)** Network referente às amostras do substrato (azul) e das pertencentes *D. annae*. Região anterior (amarelo), região média (laranja), região posterior (verde) e coprólito (ciano). OTU: Unidade Taxonômica Operacional (do inglês *Operational Taxonomic Units*). As OTUs foram definidas com 97% de similaridade. Os pequenos círculos brancos representam as OTUs. Fonte: autor (2018).



**Figura 17: Network de OTUs, em nível de gênero, das comunidades bacterianas de ambas as espécies de minhocas.** Análise comparativa dos gêneros bacterianos entre as amostras pertencentes às minhocas. Em roxo são as amostras pertencentes a *P. excavatus* e em verde são as amostras pertencentes a *D. annae*. OTU: Unidade Taxonômica Operacional (do inglês *Operational Taxonomic Units*). As OTUs foram definidas com 97% de similaridade. Os pequenos círculos brancos representam as OTUs. Fonte: autor (2018).



**Figura 18: Análise de Coordenadas Principais (PCoA).** **A)** PCoA não ponderado: a análise foi baseada na matriz de distância UniFrac, comparando as amostras com base na medida de distância filogenética das OTUs. **B)** PCoA ponderado: a análise foi baseada na matriz de distância UniFrac, comparando as amostras com base na medida de distância filogenética das OTUs e abundância relativa de OTUs. OTU: Unidade Taxonômica Operacional (do inglês *Operational Taxonomic Units*). As OTUs foram definidas com 97% de similaridade. Dados extraídos do QIIME. Fonte: autor (2018).

Neste estudo, os resultados apresentados sugerem que a passagem do substrato através do intestino de *P. excavatus* e *D. annae* modifica a estrutura da comunidade microbiana, revelando a existência de uma influência do intestino dessas espécies de minhoca sobre a microbiota do material ingerido. Os resultados mostram uma diminuição na diversidade bacteriana como resultado da passagem do substrato através do intestino. Este efeito negativo sobre a diversidade microbiana é corroborado com os resultados de outros trabalhos (PEDERSEN e HENDRIKSEN, 1993; BYZOV *et al.*, 2007; OLEYNIK E BYZOV, 2008; OWA *et al.*, 2013). Parte da riqueza estimada de espécies encontrada no substrato é representada por filos menos abundantes como Armatimonadete, Gemmatimonadetes, Spirochaetes, Synergistetes e outros. Muitos destes filos contribuem com menos de 1% para a estrutura da comunidade microbiana do substrato e grande parte destes filos sofre uma grande diminuição no intestino da minhoca. Além disso, um grande número de gêneros bacterianos que estão presentes no substrato não foi encontrado nas amostras pertencentes às minhocas. Alguns trabalhos têm apresentado evidências de que muitos organismos são eliminados enquanto outros proliferam (BYZOV *et al.*, 2007; OLEYNIK E BYZOV, 2008; OWA *et al.*, 2013). Um estudo demonstrou que diferentes bactérias gram-negativas possuem padrões distintos de sobrevivência quando consumidas por minhocas detritívoras (PEDERSEN e HENDRIKSEN, 1993). Além disso, as minhocas possuem um pool de enzimas digestivas, as quais são capazes de digerir bactéria, protozoa e fungos (DRAKE e HORN, 2007), sugerindo que as minhocas poderiam usar a comunidade microbiana como fonte alimentar. Portanto, a atividade seletiva do intestino da minhoca e a diminuição da diversidade durante a passagem do material ingerido pelo intestino é resultado da eliminação de alguns grupos bacterianos. A eliminação destes grupos pode ter ocorrido por diversos fatores como uso de bactérias como recurso alimentar, não adaptação das bactérias frente a um novo ambiente e eliminação de certos grupos bacterianos com o objetivo de regular o estado estacionário da comunidade microbiana (BYZOV *et al.*, 2007).

Horn e colaboradores (2003) sugeriram que a mudança na estrutura da comunidade microbiana seria mais quantitativa do que qualitativa. Apesar das diferentes propostas, em relação a como o ambiente do intestino causa impacto sobre a estrutura da comunidade microbiana, as evidências concordam em um ponto central: existe uma diferença entre a comunidade microbiana do intestino da minhoca e aquela que é ingerida por ela.

A microbiota intestinal da minhoca e dos coprólitos é fortemente influenciada pelo material ingerido. Um estudo mostrou evidências que a comunidade bacteriana do coprólito de *Eisenia andrei* depende do tipo de estrume ingerido pela minhoca (AIRA *et al.*, 2016). Os resultados encontrados mostraram diferenças entre as comunidades bacterianas do coprólito quando a minhoca foi alimentada com estrume de vaca, cavalo e porco. Existe um grande número de OTUs não compartilhada entre as amostras. Além disso, as comunidades do coprólito da minhoca alimentada com esterco de boi e cavalo apresentaram maior número de OTUs do filo Proteobacteria, enquanto que as minhocas alimentadas com esterco de porco tiveram um alto número de OTUs de Firmicutes.

Outros trabalhos têm suportado a proposta de que o material ingerido pela minhoca influencia a sua microbiota (PARTHASARATHI *et al.*, 2007; TAKURIA *et al.*, 2010; AIRA *et al.*, 2016). Apesar do impacto causado pela alimentação a comunidade microbiana também é influenciada pelo ambiente intestinal da minhoca. Um estudo demonstrou que a minhoca *E. andrei* alimentada com três diferentes tipos de estrumes (boi, cavalo e porco) modificou a estrutura da comunidade do material ingerido em todos os casos (GOMEZ\_BRANDÓN *et al.*, 2011). Outros trabalhos suportam a hipótese de que a microbiota do material ingerido sofre modificação na sua estrutura durante o trânsito no trato intestinal (PEDERSEN; HENDRIKSEN, 1993; TAKURIA *et al.*, 2010). Grande parte das especulações tem apontado que as diferenças encontradas deve-se a seleção exercida pelas características ambientais do intestino, pH neutro, rico em fontes de carbono e anóxico. Deste modo, o novo ambiente poderia favorecer alguns grupos bacterianos como as desnitrificantes (DRAKE). Além disso, Takuria e colaboradores (2010) apresentaram evidências de que apesar do impacto exercido pela alimentação houve influência na comunidade microbiana pelo ambiente intestinal, sendo tal influência dependente do grupo ecológico (TAKURIA *et al.*, 2010).

Os resultados apresentados pelo presente trabalho reforçam a proposta de que as minhocas influenciam e consequentemente alteram a estrutura da comunidade microbiana existente no material ingerido. Além disso, mostra evidências de que esta influência não se restringe somente a diferentes grupos ecológicos, mas também ocorrem entre espécies dentro de um mesmo grupo ecológico. Ambas as espécies do presente trabalho são epigêicas e receberam o mesmo recurso alimentar e cada uma teve um efeito diferente sobre a comunidade bacteriana do material ingerido. O filo Proteobacteria sofreu uma redução nas regiões anterior e média de ambas as espécies de minhoca tendo um aumento

na região posterior da classe Gammaproteobateria, mas esse aumento foi mais pronunciado na *P. excavatus*. O mesmo aconteceu com o filo Bacteroidetes, sendo que houve um aumento de uma classe específica, Cytophagia, na região posterior de *P. excavatus*. Outro filo que teve influência diferenciada dependente da espécie de minhoca foi o Firmicutes, que teve maior representatividade em todas as regiões do intestino de *D. annae*, especialmente na região anterior. Já na *P. excavatus* houve uma redução desse filo na região posterior e no coprólito.

Singh e colaboradores (2015) investigaram a diversidade taxonômica do microbioma intestinal de duas espécies epigêicas de minhocas, *P. excavatus* e a *Eisenia foetida*, através de análise clonal de 16S rDNA após as minhocas terem sido alimentadas à base de lignocelulolíticos. Eles observaram diferença na estrutura da comunidade microbiana do intestino entre as espécies de minhoca: em *E. foetida* foram encontrados os filos Verrucomicrobia e Chloroflexi, mas em *P. excavatus* não se observaram estes filos. Além disso, encontraram um alto número de sequências para Proteobacteria, seguido de bactérias não classificadas e Firmicutes, e a análise comparativa revelou alta abundância de Firmicutes no intestino de *P. excavatus*. Nossos resultados diferem bastante dos desses autores, pois o filo com maior abundância foi o Proteobacteria. O filo com segunda maior abundância dependeu da região do intestino, porém em todas as regiões houve pelo menos três filos com maior abundância do que o filo Firmicutes, sendo um deles Verrucomicrobia, o qual não foi encontrado no trabalho de Singh e colaboradores (2015). As diferenças encontradas podem ser devido a diferença na alimentação das minhocas, uma vez que tem se proposto que a microflora estaria em conformidade com a dieta da minhoca (PARTHASARATHI *et al*, 2007; THAKURIA *et al*, 2010). O substrato usado no presente trabalho foi esterco bovino enquanto que no trabalho de Singh e colaboradores (2015) foi à base de lignocelulolíticos.

Parthasarathi e colaboradores (2007) isolaram algumas bactérias do intestino e do coprólito de *P. excavatus* tratada com diferentes fontes alimentares. No presente trabalho a técnica empregada somente permite a acurácia até nível de gênero e na busca dos gêneros encontrados no trabalho de Parthasarathi e colaboradores (2007) somente o gênero *Enterobacter* sp. foi encontrado no presente trabalho.

De acordo com alguns estudos a população microbiana sofre diferentes influências dependendo da região do intestino da minhoca. Parece que a porção anterior do intestino funciona como filtro, ou seja, eliminando algumas espécies de bactérias,

fungos e actinomicetos, enquanto que na região posterior do intestino, os microrganismos sobreviventes teriam um lugar adequado para um rápido crescimento (IDOWU; EDEMA; ADEYI, 2005; BYZOV *et al.*, 2007; JAYASINGHE; PARKINSON, 2009). Os resultados do presente trabalho corroboram em parte com essa premissa, pois quando se é comparada a composição da comunidade bacteriana do substrato em relação à comunidade bacteriana das regiões anterior e media há uma queda da diversidade assim como da abundância de alguns filos e consequentemente de algumas classes, ou seja, a primeira e a segunda porção do intestino da minhoca podem estar atuando como filtro e assim eliminando algumas bactérias. A atividade seletiva do intestino de minhoca poderia ser um fator significativo para a nutrição do animal, bem como para regular o estado estacionário da comunidade microbiana intestinal (BYZOV *et al.*, 2007; PARTHASARATHI *et al.*, 2007).

Em relação à segunda parte da premissa apresentada no paragrafo acima, de que as bactérias sobreviventes encontrariam um ambiente favorável ao crescimento na região posterior do intestino, não pode ser verificada pelos resultados apresentados neste trabalho. A técnica empregada no trabalho permite inferir a existência de uma diferença na estrutura da comunidade bacteriana da região posterior em relação às demais porções do intestino, pois existe um aumento na abundância de alguns filos na região posterior. No entanto, a diminuição na abundância de alguns filos não permite inferir que as bactérias pertencentes a estes filos não tiveram sua biomassa aumentada na região posterior, ou seja, é possível que todas as bactérias proliferem na região posterior do intestino, porém os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que alguns filos teriam vantagens nessa região intestinal em relação aos demais e assim teriam uma maior biomassa, tornando-se assim os filos com maior abundância.

Tem sido relatado que a população microbiana de esterco bovino é dominada pelos filos Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria. A abundância relativa desses filos varia em cada estudo. Em alguns trabalhos o filo Firmicutes aparece como o filo dominante (MCGARVEY *et al.*, 2004; DOWN *et al.*, 2008; DURSO *et al.*, 2010), enquanto que em outros o filo Bacteroidetes é o responsável pela dominância (GREEN *et al.* 2004; GIRIJA *et al.*, 2012). Essas diferenças nos dados de abundância relativa se devem a vários fatores como alimentação dos animais, condições ambientais, coleta e armazenamento das amostras, assim como diferenças nos métodos de sequenciamento e análise dos dados. No presente trabalho a análise dos filos bacterianos da amostra do

substrato mostrou que a composição dos filos com maior abundância foram Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes. A maior diferença entre os dados apresentados com os dados da literatura é a predominância pelo filo Proteobacteria, o qual costuma representar o filo de terceira maior abundância em amostras de esterco bovino (GREEN *et al.* 2004; MCGARVEY *et al.*, 2004; DOWN *et al.*, 2008; DURSO *et al.*, 2010; GIRIJA *et al.*, 2012). Um dos principais motivos para essa desigualdade pode estar relacionado com as diferenças na coleta e armazenamento das amostras. Uma grande parte dos trabalhos fizeram as análises com amostras coletadas frescas. O material analisado no presente trabalho é usado pela empresa Minhobox para a alimentação das minhocas, consiste em esterco pré-compostado por 25 dias e é proveniente de vacas leiteiras. Portanto, existe uma diferença importante no intervalo de tempo entre a coleta das amostras, preparo das amostras, transporte e armazenamento, em relação aos trabalhos anteriores. Este fato pode ser relevante se considerarmos que grande parte das bactérias que contribuem para composição do filo Firmicutes são anaeróbios estritos como *Clostridium* sp (DOWD *et al.*, 2008). A mudança para um ambiente rico em oxigênio, entre outros fatores, pode estar exercendo uma pressão seletiva na comunidade bacteriana, diminuindo a quantidade de algumas bactérias que antes eram abundantes no trato intestinal do bovino.

Um segundo motivo seriam diferenças no sequenciamento do DNA e processamento de análise dos dados. Uma vez que a comparação dos resultados entre o tradicional sequenciamento do comprimento total do gene 16S rRNA e o pirosequenciamento do DNA global revelou uma grande diferença na representatividade do filo Proteobacteria, sendo 5% para o sequenciamento tradicional do gene 16S rRNA e 15% para metagenômica (DURSO *et al.*, 2010).

O solo pode ser um ambiente com pouca disponibilidade de recursos alimentares para os invertebrados os quais vivem neste meio. A maior parte destes recursos contém uma grande quantidade de carboidratos com alta massa molecular (celulose, lignina). Além disso, o nitrogênio é aprisionado em complexos de proteína-taninos. A maioria dos invertebrados do solo parece não ter o aparato necessário para a digestão de celulose, lignina e complexos húmicos, porém importantes enzimas como celulases estão presentes no intestino dos invertebrados do solo, sugerindo assim que os microrganismos ingeridos seriam a fonte dessas enzimas importantes (LAVELLE, 1997).



Embora muitos trabalhos suportem a visão de uma influência da minhoca sobre a comunidade bacteriana ingerida tem-se tido cautela em estabelecer relações de coevolução entre as minhocas e as bactérias. Algumas evidências têm suportado a hipótese que a microbiota residente no intestino da minhoca seria proveniente da comunidade microbiana da fonte alimentar e/ou do solo. A mudança na comunidade microbiana observada seria causada pela seleção exercida pelas características do meio ambiente do intestino. A comunidade microbiana estabelecida na fonte alimentar e no solo encontra um novo ambiente ao ser ingerida pela minhoca e as particularidades desse novo ambiente como baixa concentração de oxigênio, pH neutro e alta concentração de carboidratos favorecem alguns tipos bacterianos em preterimento de outros (FURLONG *et al.*, 2002; HORN; SCHIRAMM; DRAKE, 2003; IHSEN *et al.*, 2003; WÜST; HORN; DRAKE, 2011).

Apesar das evidências mostrarem que a comunidade bacteriana ingerida pela minhoca tem forte influência sobre a microbiota do intestino alguns trabalhos têm demonstrado evidências de um núcleo bacteriano nativo do intestino da minhoca que não se encontra presente nas amostras da fonte alimentar (AIRA *et al.*, 2015; PASS *et al.*, 2015).

Os resultados aqui apresentados mostram que alguns filos se destacam nas amostras pertencentes às minhocas, como o filo TM6 que é um dos filos mais abundantes nessas amostras. Na composição da comunidade bacteriana do substrato o filo TM6 contribui com menos 0,06%.

O filo TM6 foi primeiramente descrito por Rheims e colaboradores (1996) e desde então este filo tem sido identificado nos mais diferentes ambientes: água doméstica, pântano, solo, biofilmes de águas residuais e de ácidos de cavernas (LEWIS *et al.*, 2009; PACE *et al.*, 2009; HÖFLE *et al.* 2012; DEDYSH *et al.*, 2013). O genoma de um membro do filo TM6 foi recuperado do biofilme da pia de hospital e as análises do genoma revelaram que este TM6 (TM6SC1) provavelmente seja uma bactéria gram-negativa, anaeróbica facultativa e a falta de várias vias de biossíntese para a maioria dos aminoácidos sugere que este microrganismo seja obrigatoriamente membro de uma comunidade ou um simbiote de algum hospedeiro desconhecido (MCLEAN *et al.*, 2013). Embora o genoma do TM6 estudado neste artigo proceda de uma amostra completamente diferente em relação às amostras do presente trabalho, a indicação de que o filo TM6 seja composto por bactérias anaeróbicas facultativas e obrigatórias ou

simbiontes ou parte de uma comunidade explicam porque esta presente nas amostras do trato intestinal da minhoca. A preferência do filo TM6 pelas regiões anterior e média pode estar relacionada com seu nível de participação na digestão da matéria orgânica, uma vez que o genoma TM6SC1 revelou a existência de genes para a hidrólise extracelular de celobiose (MCLEAN *et al.*, 2013).

Os membros pertencentes ao filo Verrumicrobia são encontrados no meio terrestre, água doce e salgada, e apenas uma parcela de seus representantes são cultiváveis (VANDEKERCKHOVE *et al.*, 2000; YOON, 2011). No solo costuma estar sempre presente, apesar de normalmente ser considerado um dos filos menos abundantes. Algumas classes deste filo costumam crescer em campos agrícolas enquanto que a classe Spartabacteria, a qual costuma ser abundante, diminui. Além disso, a abundância deste filo costuma crescer no solo em profundidade intermediária (BERAGMANN *et al.*, 2011). O gênero que mais contribui para a formação deste filo nas amostras de minhocas é o *Candidatus xiphinematobacter*, um parasita de nematóide (Xiphinema) especializado em infectar os ovários e possui transmissão vertical, sendo cada espécie de simbiote específica para cada nematóide (VANDEKERCKHOVE *et al.*, 2000). Considerando a especificidade do gênero *Candidatus xiphinematobacter* é provável que as sequências encontradas não pertençam a este gênero, mas sim a um novo grupo de bactérias ainda não estudadas que tenham certo grau de similaridade com este gênero relacionado aos nematóides. Existem evidências de transferência vertical de um consórcio de bactérias entre a minhoca e os casulos depositados por elas (DAVIDSON; POWELL; STAHL, 2010), sendo possível que o filo Verrumicrobia abrigue um grupo de bactérias ainda não conhecido relacionado com as minhocas.

A classe Cytophagia pertencente ao filo Bacteroidetes se destaca na comunidade bacteriana da região posterior de *P. excavatus*, especificamente pela família Cytophagacea. Os membros desta família são bactérias gram-negativas e muitas são conhecidas por suas habilidades de digestão de polissacarídeos (Prokaryotes, 2014). Um dos dois gêneros mais abundantes da família Cytophagacea, nas amostras de *P. excavatus*, faz parte dos gêneros não cultiváveis e na anotação pelo QIIME não recebeu atribuição taxonômica. O outro gênero é *Sporocytophaga*, o qual contém apenas uma única espécie, *S. myxococcoides*, que hidrolisa eficientemente celulose cristalizada e possui propriedades de microcistos (Prokaryotes, 2014). Contudo *S. myxococcoides* tem sido descrita como aeróbica estrita (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2015),

este fato vai contra as características do trato intestinal da minhoca que possui um baixo nível de oxigênio (DRAKE e HORN, 2007). Se a classificação no nível de gênero estiver correta há duas explicações possíveis: 1) a existência de outra espécie para esse gênero, 2) a parede do intestino da minhoca seria um microambiente com disponibilidade de oxigênio explicando a ocorrência de membros aeróbicos encontrados na parede do intestino da minhoca. Tal fenômeno foi descrito nas paredes do intestino de cupins (NAKAJIMA *et al.*, 2005).

Firmicutes e Proteobacteria são filos que têm sido reportados em solo, água, intestino e fezes de animais. Recentemente foi sugerido que membros das famílias Clostridiaceae e Enterobacteriaceae são fermentadores ativos do conteúdo intestinal de minhoca, pertencentes aos filos Firmicutes e Proteobacteria, respectivamente (WÜST, HORN e DRAKE, 2011). Algumas espécies do gênero *Clostridium* são consideradas anaeróbicas obrigatórias e podem dissimilar glicose para acetato, butirato, lactato, etanol e CO<sub>2</sub> (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2015). Os produtos da fermentação realizada por membros da família Enterobacteriaceae são formato, succinato, lactato, acetato, etanol e CO<sub>2</sub> (BRENNER e FARMER, 2005). Algumas Enterobacteriaceae são capazes de reduzir nitrato a nitrito, o que poderia explicar as menores concentrações de nitrato encontradas no intestino em relação ao solo (HORN *et al.*, 2003).

As características dos filos e das classes abundantes assim como alguns gêneros encontrados no presente trabalho sugerem que o intestino da minhoca promove a construção de uma comunidade bacteriana que auxilia no processamento da matéria orgânica, onde a digestão de polissacarídeos parece ser um dos principais processos. Além disso, o padrão de distribuição dos microrganismos encontrados sugere que diversos organismos teriam preferência por certas regiões do intestino. Essa preferência por certos microambientes entéricos deve levar a formação de clusters microbiais, os quais apresentariam enzimas específicas, sendo assim responsáveis por diferentes níveis de digestão nas diferentes regiões (OWA *et al.*, 2011).

As relações evolutivas entre a microbiota do intestino da minhoca e seus hábitos alimentares ainda permanece obscuro. Sistemas digestivos podem levar a alguns tipos de associação como digestão direta, simbiose e mutualismo facultativo (LAVELLE, 1997). Existem evidências que parte da comunidade bacteriana ingerida pela minhoca seria digerida (BYZOV *et al.*, 2007; OLEYNIK E BYZOV, 2008; OWA *et al.*, 2013). A questão do mutualismo facultativo ou da simbiose é um pouco mais complexa. O estudo

das relações mutualísticas tem apontado um alto grau de especialização, ou seja, que ocorre entre um par de espécies como no caso entre figos e vespas é raro. O mais comum seria as relações entre grupos maiores, ou seja, envolvendo uma gama de relações dentro de certo grau de parentesco como acontece com um gênero de orquídea que é polinizado por diversas abelhas da subfamília Euglossinae. Além disso, as relações facultativas entre os organismos parece ser a regra e os casos de mutualismos simbióticos seriam possivelmente originados da relação entre hospedeiro e parasita (HOWE, 1984).

O estudo da microbiota do intestino de carnívoros, herbívoros e onívoros tem mostrado que a dieta, a fisiologia e a anatomia do hospedeiro influenciam a estrutura da comunidade microbiana (LEY *et al.*, 2008; WATZL *et al.*, 2015). O mesmo acontece com a minhoca e assim dessas diferentes influências devem ocorrer as relações facultativas entre as minhocas e as bactérias. Os estudos da microbiota intestinal de vários tipos de animais desde insetos até mamíferos mostram que o perfil da microbiota do intestino da minhoca seja essencial para o seu metabolismo (HONGO, ONKUMA e KUDO, 2003; LEY *et al.*, 2008; WATZL *et al.*, 2015). Além disso, parece que algumas espécies de minhocas dependeriam das bactérias para a realização da digestão de celulose enquanto outras minhocas possuiriam todas as enzimas necessárias (LATTAUD *et al.*, 1999). A existência de tal dependência, pelo menos para algumas espécies de minhoca, permite a especulação da existência de uma relação simbiótica entre as bactérias e a minhoca. O presente trabalho propõe os filos Chlamydiae, TM6, Proteobacteria e Verrucomicrobia, devido as suas características, como grupos candidatos a terem alguma bactéria que desenvolveu um forte mutualismo com a minhoca assim como acontece com o Termite Group I em cupins (HONGO, ONKUMA e KUDO, 2003).

### **5.3 Sequenciamento genômico global e metatranscriptoma**

A metagenômica do gene específico utilizando o gene 16S rRNA é uma maneira mais rápida para a obtenção do perfil de distribuição taxonômica da comunidade. A distribuição taxonômica pode subsequentemente ser associada com dados ambientais (metadados). A metagenômica *shotgun* tem a capacidade de sequenciar a maioria dos genomas dentro de uma amostra ambiental (comunidade). Essa abordagem possibilita analisar a composição funcional de organismos conhecidos ou desconhecidos. A metagenômica de gene 16S rRNA responde a questão de quem está nesse ambiente e a

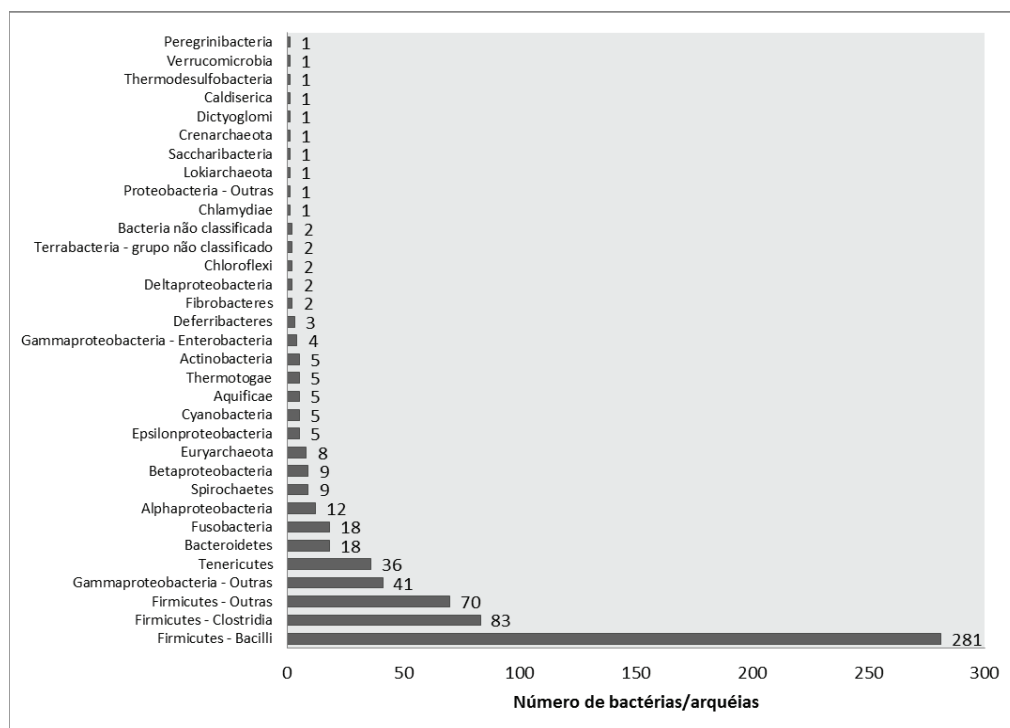
metagenômica *shotgun* responde a questão o que eles estão fazendo nesse ambiente e como estes microrganismos interagem para manter um nicho ecológico equilibrado. Para construir a diversidade metabólica presente no intestino da minhoca foi adotada a abordagem metagenômica *shotgun*.

### 5.3.1 Biodiversidade

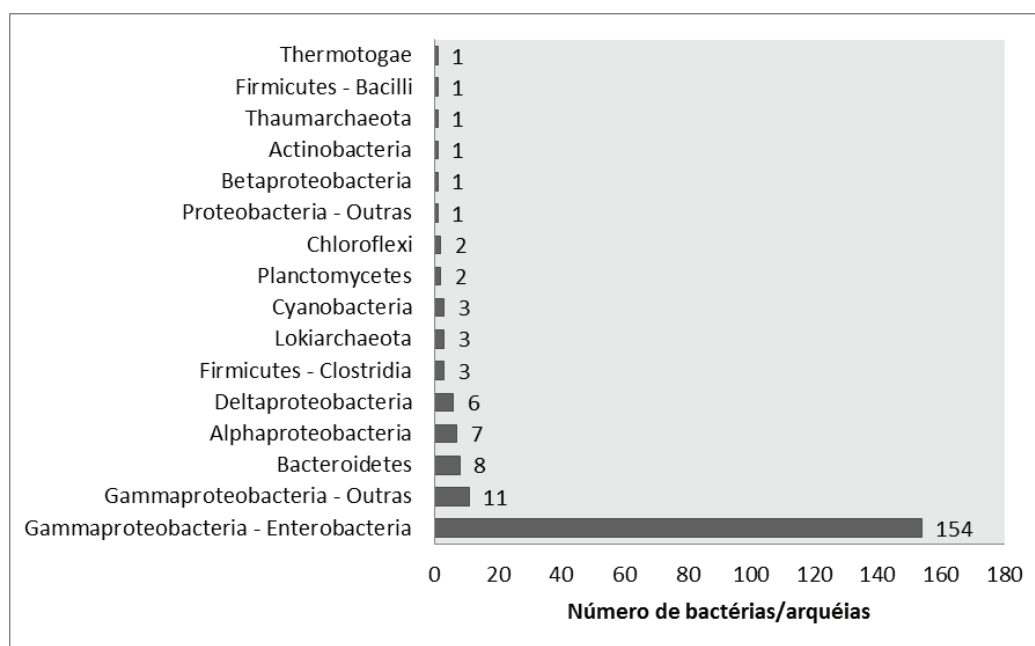
A anotação realizada utilizando o banco de dados do KEGG via a ferramenta de anotação interna KOALA realizou atribuição taxonômica para algumas *ORFs* das amostras (Figuras 19, 20 e 21). O filo Firmicutes foi predominante nas regiões anterior e média de *P. excavatus*, seguido do filo Proteobacteria, que teve como classe dominante Gamaproteobacteria (Figura 19). A região posterior de *P. excavatus* possui o filo Proteobacteria como dominante, o qual teve como classe principal Gamaproteobacteria, e família principal as Enterobacterias (Figura 19). O segundo filo com maior dominância foi o Bacteroidetes e o terceiro, Firmicutes (Figura 20). A região posterior de *D. annae* teve como filo dominante Proteobacteria, tendo como classe dominante Alfaproteobacteria (Figura 21).

O filo Proteobacteria predominou em todas as amostras de acordo com a análise do metagenoma do gene 16S rRNA o que difere dos dados obtidos da biodiversidade pelo metagenoma do sequenciamento do DNA genômico global para as amostras das regiões anterior e média de *P. excavatus* enquanto que para as amostras da região posterior de ambas as minhocas os dados corroboram.

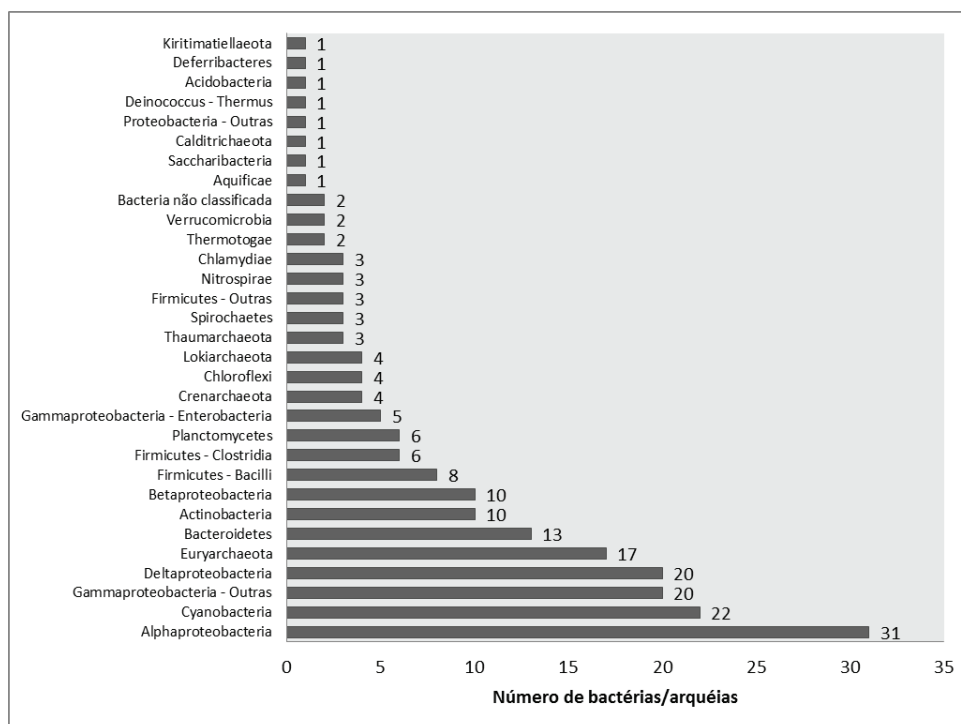
A nível de classe os dados obtidos para a biodiversidade do sequenciamento do DNA genômico global corroboram com os dados obtidos pelo sequenciamento do 16S rDNA para as amostras da região posterior de *P. excavatus*, nessa região houve a predominância da classe Gamaproteobacteria em ambas as análises. Os dados também estão de acordo em nível de família, onde houve predominância das Enterobactérias nessa porção de *P. excavatus*.



**Figura 19: Atribuição taxonômica da amostra das regiões anterior e média de *P. excavatus*.** Anotação da categoria taxonômica das *ORFs* obtidas através do programa Prodigal via a ferramenta de anotação interna do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), KOALA (KEGG Orthology And Links Annotation), no modo GhostKOALA. Fonte: autor (2018).



**Figura 20: Atribuição taxonômica da amostra da região posterior de *P. excavatus*.** Anotação da categoria taxonômica das *ORFs* obtidas através do programa Prodigal via a ferramenta de anotação interna do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), KOALA (KEGG Orthology And Links Annotation), no modo GhostKOALA. Fonte: auro (2018).



**Figura 21: Atribuição taxonômica da amostra da região posterior de *D. annae*.** Anotação da categoria taxonômica das *ORFs* obtidas através do programa Prodigal via a ferramenta de anotação interna do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), KOALA (KEGG Orthology And Links Annotation), no modo GhostKOALA. Fonte: autor (2018).

Em nível de classe, os dados obtidos para a biodiversidade do sequenciamento do DNA genômico global diferiram um pouco dos dados obtidos com o sequenciamento do 16S rDNA, para as amostras da região posterior de *D. annae*. Os dados da análise do 16S rDNA mostram a classe Gamaproteobacteria como classe dominante, seguida da classe Alphaproteobacteria, enquanto no sequenciamento global ocorreu o inverso. Outra diferença entre os dados, é que de acordo com a análise do 16S rDNA, houve quantidade maior de Planctomycetes, seguido de Actinobacteria e depois Firmicutes, seguido de Bacteroidetes enquanto que no dados do sequenciamento global Bacteroidetes foi seguido de Actinobacteria, depois Firmicutes seguido de Planctomycetes. Apesar dessas diferenças, os filos que apareceram em maiores quantidades são os mesmos na região posterior de *D. annae*.

Os dados de biodiversidade da análise de 16S rDNA e do sequenciamento global para as regiões posteriores de ambas as minhocas são semelhantes entre si. A maior diferença entre os dois tipos de dados são referente às regiões anterior e média de *P. excavatus*; os dados da análise do 16S rDNA parecem ser os mais corretos quanto ao filo de maior abundância considerando que o filo Proteobacteria é dominante em todas as

amostras de acordo com essa abordagem. E esses dados para as regiões posteriores de ambas as minhocas são confirmados com os dados do sequenciamento global. Em relação aos demais filos, os dados do sequenciamento global mostram a possibilidade do filo Firmicutes ter uma abundância maior do que sugerem os dados do sequenciamento do 16S rDNA.

### 5.3.2 Anotação funcional

A biblioteca que compõe a região anterior e média do intestino de *P. excavatus* foi denominada de E1 e a biblioteca da região posterior de E2. A biblioteca que compõe a região anterior e média do intestino de *D. annae* foi denominada de A1 e a biblioteca da região posterior de A2. Foi obtido um total de 27.286.081 sequências pertencentes às amostras após a etapa de refino (tabela 12). A montagem realizada a partir dessas sequências resultou em *contigs* representando 29%, 37%, 2% e 57% do total das sequências depois de refinadas das amostras E1, E2, A1 e A2 respectivamente (Tabela 12). O programa Prodigal foi usado para a predição de *ORFs*, resultando um total de 240.191 *ORFs*. A anotação funcional realizada contra o banco de dados do COG resultou num total de 2.733 *ORFs* anotadas, enquanto que para o banco de dados do UNIPROT50 totalizaram 2.447 *ORFs* anotadas. A anotação funcional realizada pela anotação interna do KEGG, o KOALA, resultou num total de 5.749. A anotação pelo KEGG pelo KAAS resultou em 1.529. Os detalhes das anotações estão na tabela 13. A biblioteca da amostra A1 não foi avaliada devido ao baixo número de *ORFs*.

**Tabela 12: Sequências, *contigs* e *ORFs* preditas do sequenciamento global das amostras de *P. excavatus* e *D. annae*.**

Amostra	Número de leituras totais	Número de leituras trimadas	Número de <i>Contigs</i>	Número <i>ORFs</i> preditas
A1	37.566	37.367	23	19
A2	10.542.235	10.506.397	321.895	191.618
E1	5.713.148	5.617.060	17.259	11.587
E2	11.172.596	11.125.257	65.082	36.967
Total	27.465.545	27.286.081	404.259	240.191

As amostras são indicadas pelas letras E ou A para *P. excavatus* e *D. annae*, respectivamente, seguidas dos números 1 e 2 para o intestino anterior e intestino médio, e intestino posterior respectivamente.

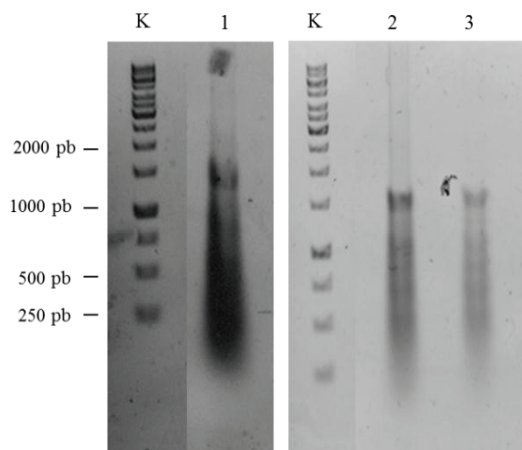


**Tabela 13: *ORFs* anotadas do sequenciamento global das amostras de *P. excavatus* e *D. annae*.**

Amostra	Número <i>ORFs</i> anotadas			
	COG	UNIPROT50	KEGG (KOALA)	KEGG (KAAS)
A2	1.248	1.107	3.774	534
E1	1.084	963	892	743
E2	401	377	1.083	252
Total	2.733	2.447	5.749	1.529

Número de *ORFs* anotadas para cada banco de dados usado como referência. As amostras são indicadas pelas letras E ou A para *P. excavatus* e *D. annae*, respectivamente, seguidas dos números 1 e 2 para o intestino anterior e intestino médio, e intestino posterior respectivamente.

O RNA total das amostras do intestino da minhoca *P. excavatus* foi extraído e o resultado se encontra na figura 22. A triplicata biológica das amostras de RNA rendeu um total de 10.006.415 sequências após a etapa de refino e 3.204.702 após as etapas de filtragem (Tabela 14). A montagem realizada a partir dessas sequências resultou em *contigs* representando 82%, 88%, e 90% do total das sequências depois de refinadas e filtradas das amostras E001, E002, E003 respectivamente, resultando em 465, 232 e 1.344 *contigs* (Tabela 15). O programa Prodigal foi usado para a predição de *ORFs*, resultando um total de 1.697 *ORFs*. A anotação funcional realizada pela anotação interna do KEGG, o KOALA, resultou num total de 158 *ORFs* anotadas (Tabela 15). O mapeamento realizado contra as *ORFs* originadas das sequências do metagenoma resultou num total de 3.611 *ORFs* mapeadas para a biblioteca da amostra das regiões anterior e média (E1) e 4.926 *ORFs* para a região posterior (E2) de *P. excavatus* (Tabela 16). Uma pequena parcela dessas *ORFs* foi anotada como mostra a tabela 16. A abundância de leituras que mapearam *ORFs* desconhecidas foi alta, e uma das possíveis razões para isto é o número de anaeróbicos residentes no intestino. Bactérias anaeróbicas são mais difíceis de caracterizar geneticamente do que bactérias aeróbicas (BROWN *et al.*, 2011).



**Figura 22: Extração do RNA total das amostras do intestino da minhoca *P. excavatus*.** Gel de agarose 1% em tampão TBE 1X a 60 volts. A letra K é referente marcador 10 kb DNA ladder (Fermentas). Os números 1, 2 e 3 representam a triplicata biológica da extração de RNA. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida pelo sistema de fotodocumentação UVP. Fonte: autor (2018).

**Tabela 14: Sequências do sequenciamento do cDNA.**

Amostra	Número de leituras totais	Número de leituras refinadas	Número de leituras após filtragem
E001	2.675.251	2.571.601	879.480
E002	2.970.676	2.845.437	807.081
E003	4.793.743	4.589.377	1.518.141
Total	10.439.670	10.006.415	3.204.702

Sequências de baixa qualidade ( $Q < 30$ ) e curtas ( $< 30$  bp) foram descartadas. Filtragem: as sequências de boa qualidade foram mapeadas contra o banco de dados de rRNA SILVA e contra os genomas de *Eisenia fetida* e *Amyntas corticis*. As sequências mapeadas foram descartadas. E001, E002 e E003 correspondem à triplicata biológica do conteúdo intestinal de *P. excavatus*.

**Tabela 15: *Contigs*, *ORFs* preditas e anotadas do sequenciamento do cDNA.**

Amostra	Número de <i>Contigs</i>	Número <i>ORFs</i> preditas	Número de <i>ORFs</i> anotadas
E001	465	405	36
E002	232	171	6
E003	1.344	1.121	116
Total	2041	1697	158

**Tabela 16: Mapeamento contra as *ORFs* metagenoma**

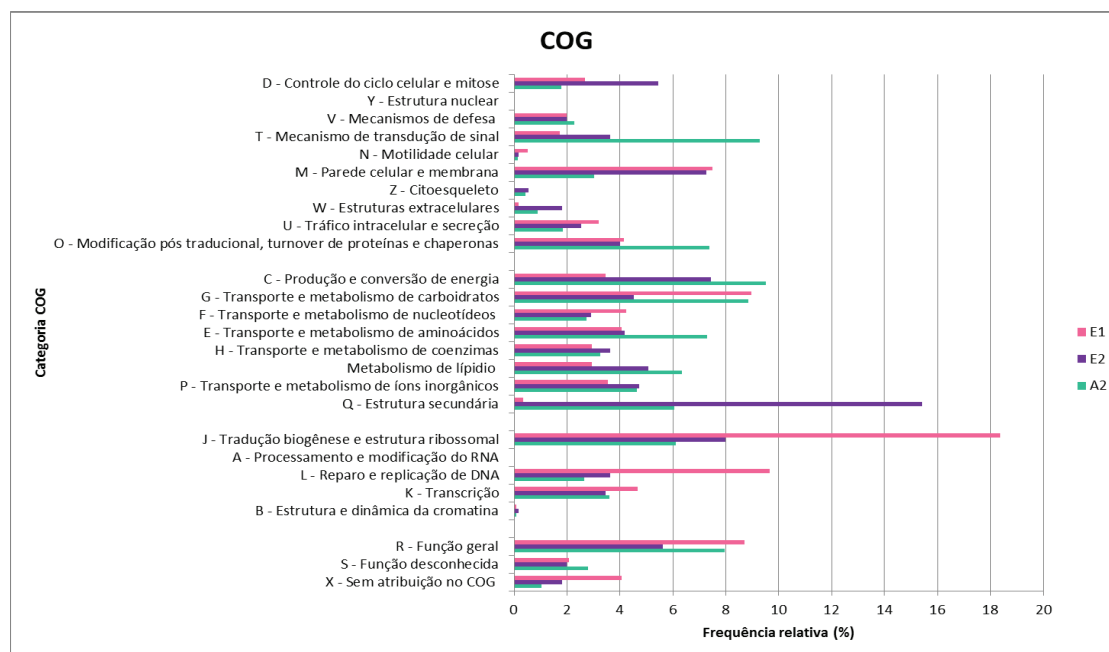
Amostra	Número de <i>ORFs</i> mapeadas	Número de <i>ORFs</i> mapeadas anotadas
	<i>ORFs</i> E1 - <i>ORFs</i> E2	<i>ORFs</i> E1 - <i>ORFs</i> E2
E001	1316 - 3105	136 - 101
E002	715 - 502	76 - 19
E003	1580 - 1319	146 - 46
Total	3611 - 4926	358 - 166

As leituras do metatranscriptoma foram mapeadas contra as *ORFs* geradas das sequências do metagenoma. O mapeamento foi realizado separadamente contra as *ORFs* geradas das bibliotecas das amostras E1 e E2. O mapeamento foi realizado pelo CLC Genomics Workbench versão 7.

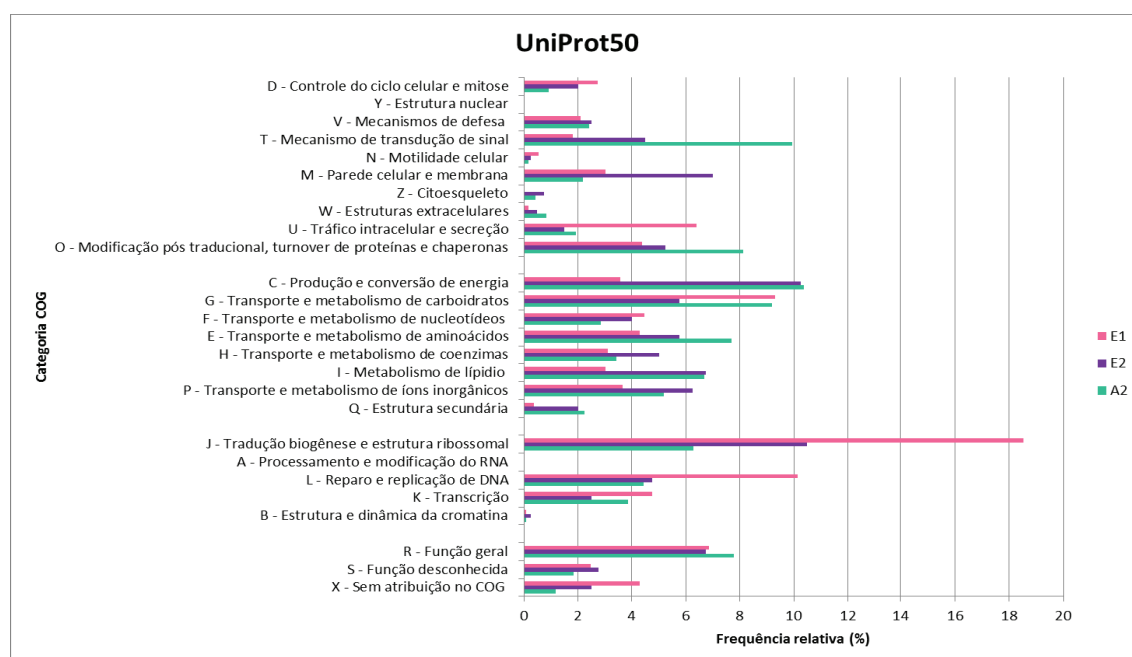
A anotação funcional do metagenoma usando como o banco de dados o COG e o UniProt50 tiveram resultados semelhantes (Figuras 23 e 24) e ambas as anotações foram classificadas em categorias do COG. A frequência relativa dos genes dentro de algumas categorias foi conservada dentro das regiões do intestino e entre as espécies de minhocas em ambas as anotações. Estes incluem genes envolvidos com o transporte e metabolismo de coenzimas, ions inorgânicos e mecanismos de defesa.

As grandes diferenças na frequência relativa encontram-se nas categorias de tradução, biogênese e estrutura ribossomal e reparo e replicação do DNA que teve uma quantidade maior de genes para as regiões anterior e média de *P. excavatus*. Na categoria de produção e conservação de energia e metabolismo de lipídios que teve um número menor de genes para esta região. As categorias mecanismo de transdução de energia e modificação pós traducional, “turnover” de proteínas e chaperonas teve uma quantidade maior de genes para a região posterior de *D. annae*.

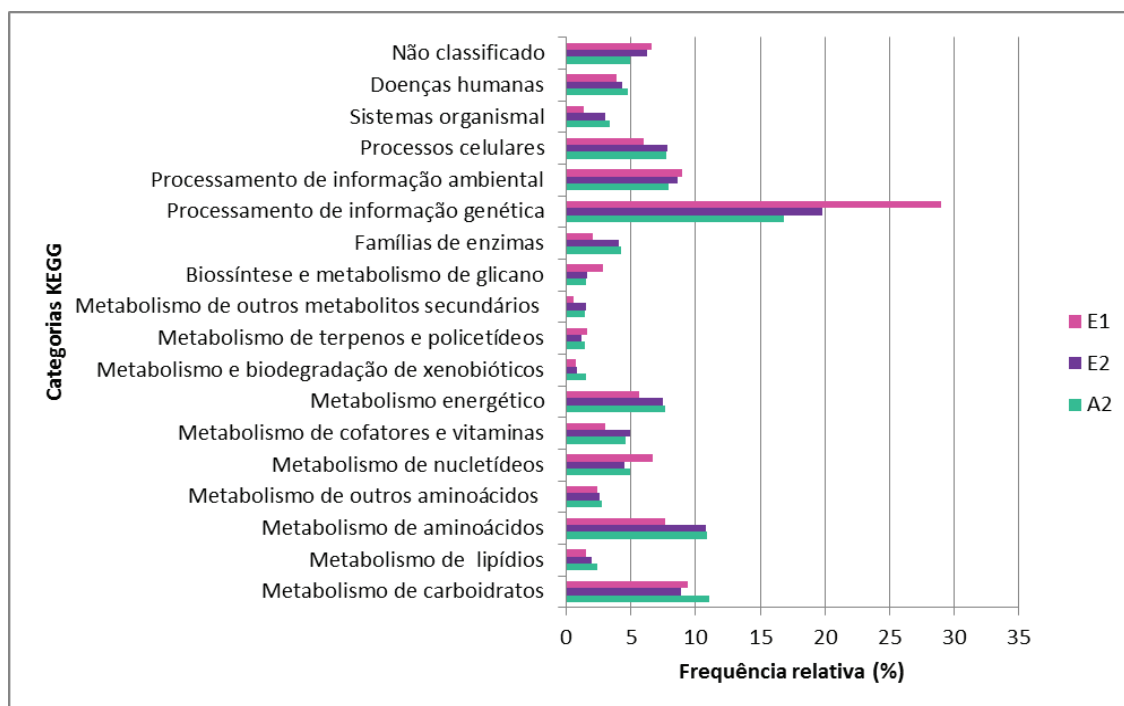
As *ORFs* anotadas utilizando o banco de dados do KEGG pelo KOALA também foram classificadas em categorias, contudo, vale ressaltar que as *ORFs* podem ser classificadas em mais de uma categoria. A frequência relativa dos genes dentro de algumas categorias foi conservada dentro das regiões do intestino e entre as espécies de minhocas. A maior diferença se encontra na categoria de processamento de informação genética que teve uma porcentagem maior para as regiões anterior e média de *P. excavatus* (Figura 25). As regiões posteriores de ambas as espécies de minhoca possuem uma maior porcentagem de *ORFs* nas categorias famílias de enzimas, metabolismo energético e metabolismo de aminoácidos (Figura 25).



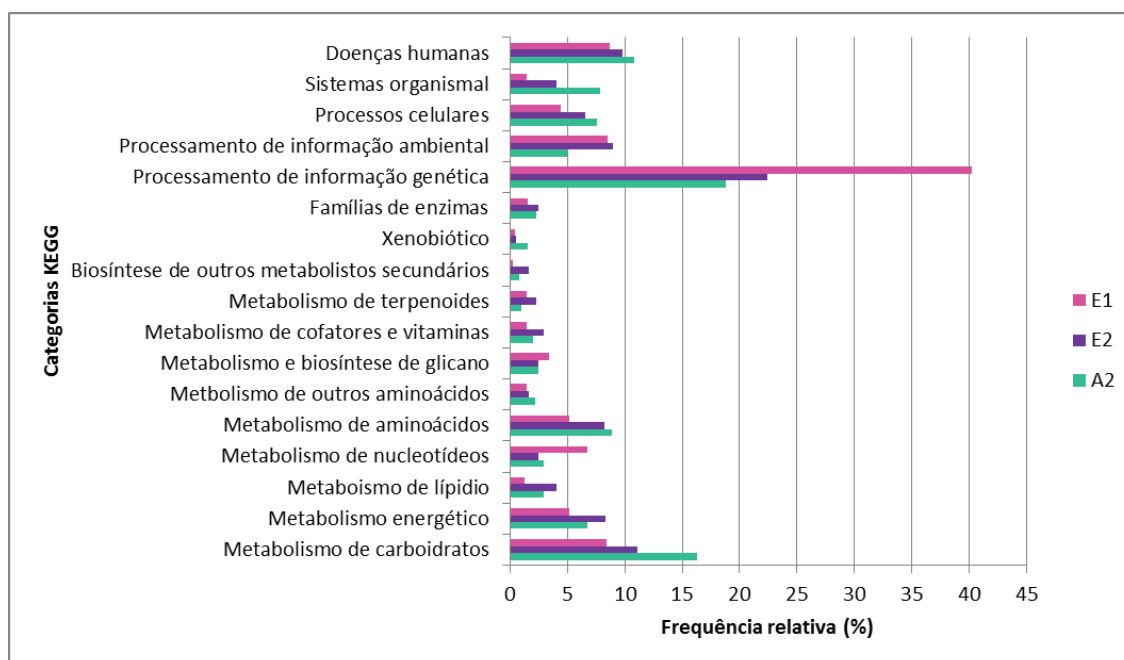
**Figura 23: Anotação funcional via COG classificada em categorias funcionais.** A anotação funcional das sequências metagenômicas o intestino de *P. excavatus* e *D. annae*. As sequências metagenômicas foram comparadas com o programa BLASTp contra o banco de dados do COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) e distribuídas em 17 categorias do sistema COG. Fonte: autor (2018).



**Figura 24: Anotação funcional via UniProt50 classificada em categorias funcionais.** A anotação funcional das sequências metagenômicas o intestino de *P. excavatus* e *D. annae*. As sequências metagenômicas foram comparadas com o programa BLASTp contra o banco de dados do UniRef [Uniprot (Universal Protein Resource) Reference Clusters] e distribuídas em 17 categorias do sistema COG. Fonte: autor (2018).



**Figura 25: Classificação das *ORFs* em categorias do KEGG via KOALA.** A anotação funcional foi realizada pela ferramenta de anotação interna do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), KOALA (KEGG Orthology And Links Annotation), no modo GhostKOALA. Fonte: autor (2018).



**Figura 26: Classificação das *ORFs* em categorias do KEGG via KAAS.** A anotação funcional foi realizada através do servidor de anotação automática do KEGG, o KAAS (KEGG Automatic Annotation Server) no modo GhostX e pelo método SHB (single directional best hit). Fonte: autor (2018).

As *ORFs* anotadas utilizando o banco de dados do KEGG pelo KAAS foram classificadas em categorias. Comparando as anotações via KOALA e KAAS, os

resultados se mostram semelhantes quanto à distribuição de *ORFs* nas categorias (Figuras 25 e 26). Na anotação via KAAS ocorre um aumento na categoria de metabolismo de carboidratos para a região posterior de *D. annae* (Figura 26). Além disso, há uma diminuição na categoria de metabolismo de nucleotídeos para as regiões posteriores de ambas as minhocas e um aumento nas regiões anterior e média de *P. excavatus* (Figura 26).

As quatro anotações realizadas obtiveram resultados diferentes quanto ao número total de *ORFs* anotadas. O sistema de anotação com o maior número de *ORFs* anotadas foi o KOALA. Apesar das diferenças no número total, a frequência relativa das *ORFs* foi semelhante entre as categorias dos sistemas. As regiões anterior e média tiveram uma grande parcela de genes anotados para processamento de informação genética, que inclui replicação e reparo do DNA, transcrição e tradução. As regiões posteriores apresentaram aumento discreto na porcentagem do metabolismo de lipídios em todas as anotações. De maneira geral os dados indicam a existência de uma diferença entre as regiões anterior e média e a região posterior de *P. excavatus*.

As subcategorias da categoria de Doenças humanas são Câncer, Doença neurodegenerativas, Doenças imunológicas, Doenças cardiovasculares, Doenças Prion e Doenças infecciosas. Os genes que foram anotados via KAAS nesta categoria em grande parte correspondem ao fator de transcrição AP-1 que regula a expressão gênica em resposta a vários estímulos diferentes como citocinas, fatores de crescimento, estresse e infecção bacteriana. A enzima piruvato quinase foi anotada para várias *ORFs* desta categoria como também outras enzimas envolvidas na via glicolítica. Outros genes que foram anotados nesta categoria são a cadeia pesada da dineína, a enzima superóxido dismutase, histonas H2A e H2B, histona H3, histona H4, proteína de ligação à penicilina 1A, entre outros. Parte dos genes anotados estão relacionados a regulação de transcrição, proteínas do citoesqueleto e sinalização celular, sendo que alguns destes genes quando possuem mutação ou super expressão se encontram relacionados ao desenvolvimento de câncer. Os dados referentes à anotação via KOALA para esta categoria se mostram similares.

As anotações dos dados do metagenoma realizadas via KAAS e KOALA foram usadas para a construção de vias metabólicas, apesar da anotação via KAAS ter um número inferior de *ORFs* anotadas a comparação das vias metabólicas mostrou diferença entre as anotações e elas se complementam (dados não mostrados). Portanto, os dados de

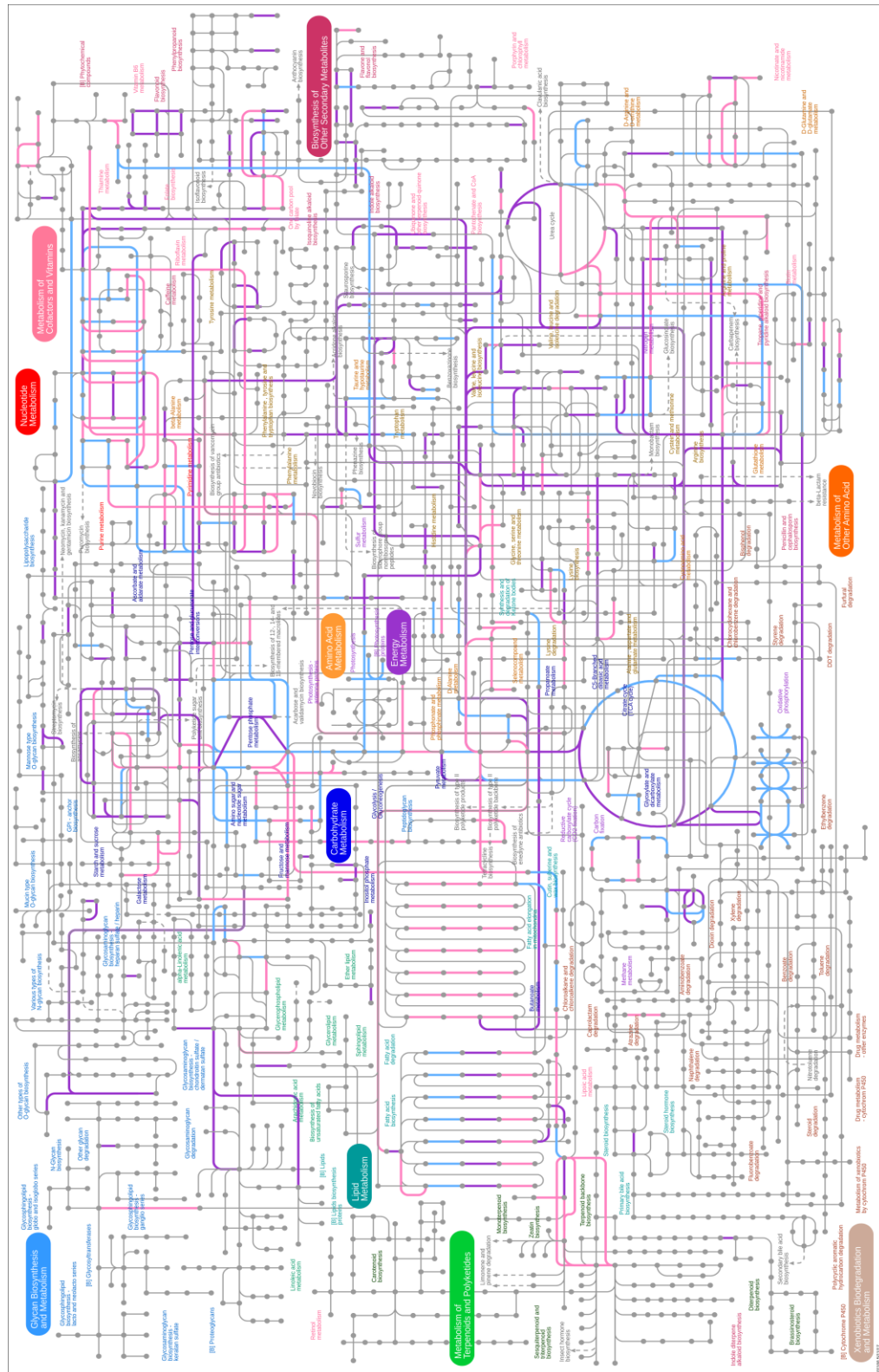
ambas as anotações foram unidos e plotados conjuntamente (Figuras 27 e 28). A pequena diferença encontrada entre as anotações do KOALA e o KASS deve ser devido a diferentes genomas usados como referência.

Comparando as vias metabólicas entre as espécies de minhocas verificou-se que a região posterior de *D. annae* teve um número superior de genes anotados quando comparada com as regiões anterior, média e posterior de *P. excavatus* (Figuras 27 e 28). As maiores diferenças se encontram para o metabolismo de energia, lipídeos e aminoácidos.

Os dados apresentados mostram que todas as regiões do intestino das minhocas possuem um perfil semelhante para genes com funções relacionadas ao metabolismo central como metabolismo de carboidratos, aminoácidos, nucleotídeos, metabolismo energético e de vitaminas.

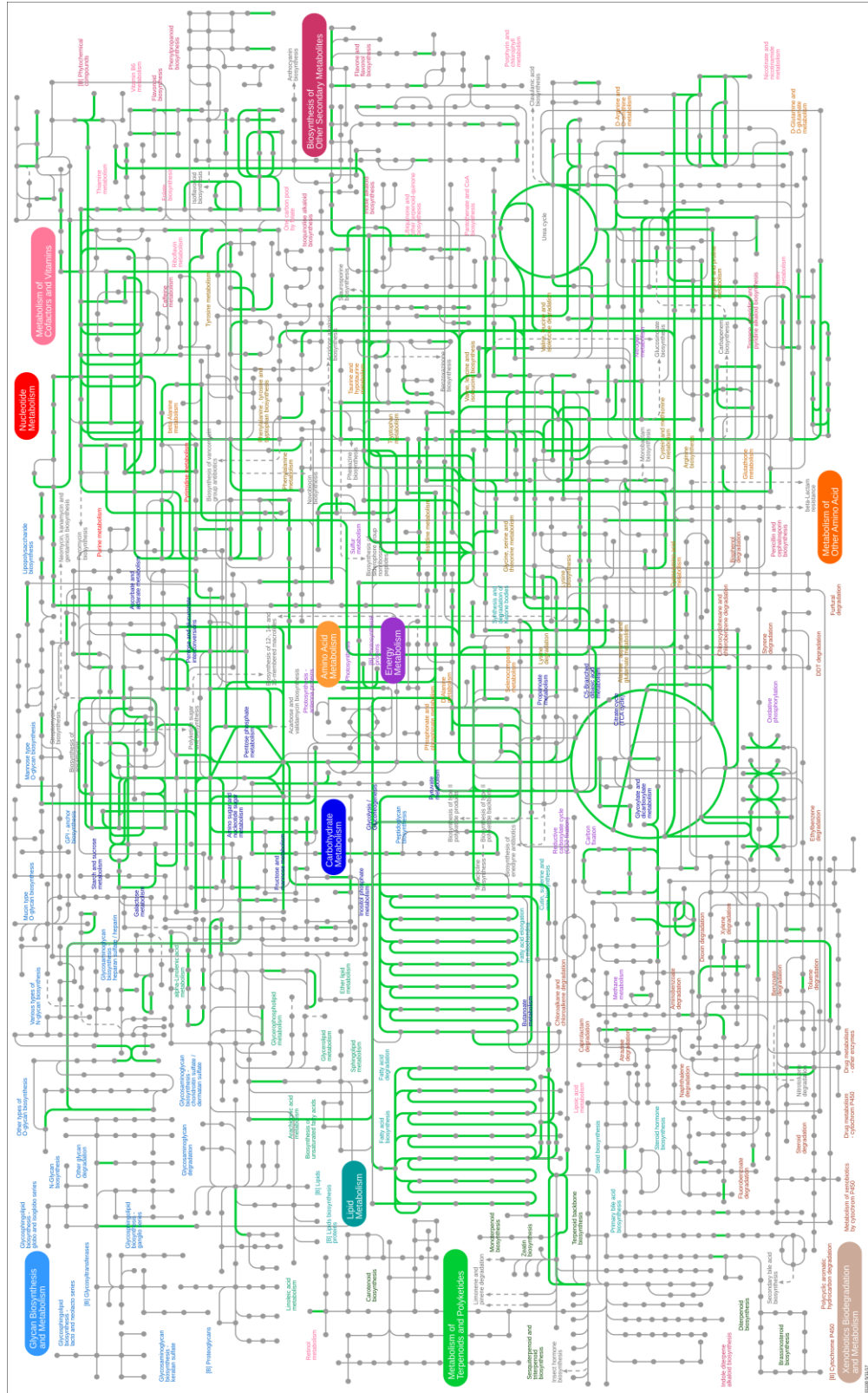
As estratégias adotadas para anotação mostram que o sistema que apresentou o maior número de *ORFs* anotadas foi o KOALA seguido do KAAS. As anotações realizadas através de Blastp utilizando o banco de dados do COG e do UNIPROT50 foram as estratégias que renderam o menor número de genes anotados. Apesar do baixo número de genes anotados através dessas abordagens, estas anotações podem complementar informações de análise mais pontual, como a busca por hidrolases (Figura 29). A anotação realizada utilizando o banco de dados do COG anotou algumas hidrolases que não foram anotadas utilizando o banco de dados do KEGG. O melhor sistema para a caracterização funcional das comunidades bacterianas para as amostras estudadas foi o KOALA, porém a anotação via KAAS complementou a anotação via KOALA. Portanto a anotação mais completa deve ser a união dos dois resultados e deste modo pode-se realizar uma melhor caracterização funcional e fisiológica da microbiota intestinal da minhoca.

Utilizando a ferramenta *iPath* versão 3 foi desenhado o mapa das vias metabólicas dos genes anotados que teve cobertura das leituras do metatranscriptoma e das *ORFs* preditas e anotadas proveniente do sequenciamento do metatranscriptoma (Figura 29).

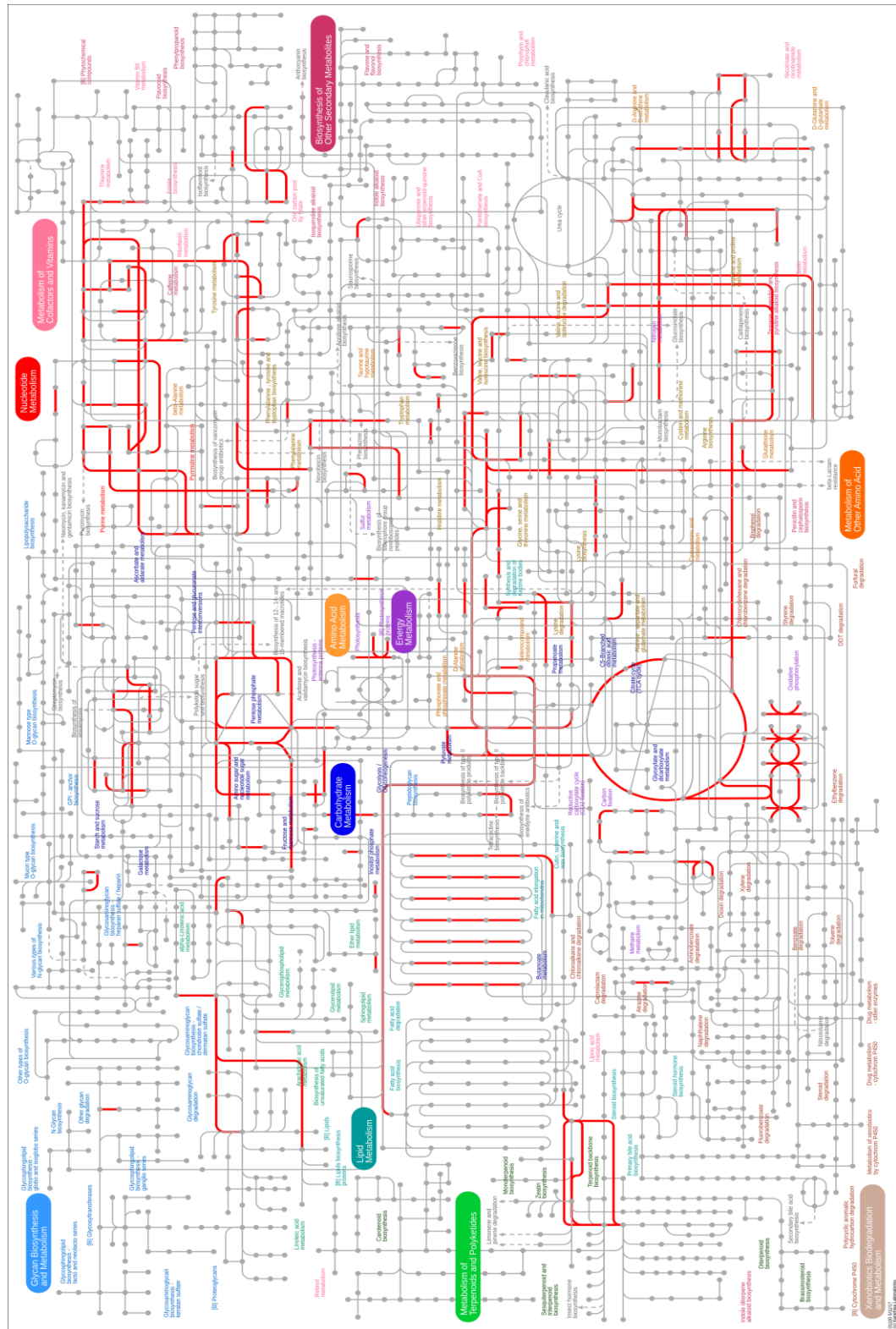


**Figura 27: Vias metabólicas das amostras de *P. excavatus*.** Em rosa as vias metabólicas das regiões anterior e média (amostras E1) e em roxo da região posterior (amostra E2) do intestino da minhoca. Em azul as vias regulatórias que são comuns em todas as regiões do intestino. A anotação funcional das *ORFs* geradas pelo prodigal foi realizada utilizando o banco de dados do KEGG via KAAS e KOALA. As vias metabólicas foram desenhadas usando a ferramenta ipath v3. Fonte: autor (2018).





**Figura 28: Vias metabólicas da amostra de *D. annae*.** Em verde as vias metabólicas da região posterior (amostra A2) do intestino da minhoca. A anotação funcional das *ORFs* geradas pelo prodigal foi realizada utilizando o banco de dados do KEGG via KAAS e KOALA. As vias metabólicas foram desenhadas usando a ferramenta ipath v3. Fonte: autor (2018).



**Figura 29: Vias metabólicas do intestino de *P. excavatus*.** Em vermelho as vias metabólicas transcritas de todo o intestino da minhoca. A anotação funcional foi realizada através do mapeamento das leituras do metatranscriptoma contra as *ORFs* anotadas do metagenoma. A anotação funcional das *ORFs*, geradas pelo Prodigal que utilizou os *contigs* montados das leituras do metatranscriptoma, foi realizada utilizando o banco de dados do KEGG via KOALA. As vias metabólicas foram desenhadas usando Ipath v3. Fonte: autor (2018).

Apesar do baixo número de genes anotados no metatranscriptoma, os dados apresentados mostram que o intestino de *P. excavatus* possui genes sendo transcritos para as funções relacionadas ao metabolismo central como metabolismo de carboidratos, aminoácidos, nucleotídeos e metabolismo energético (Figura 29).

Uma profundidade maior no sequenciamento pode aumentar a cobertura dos genes presentes e consequentemente melhorar a quantidade de informação. Deste modo muitos dos genes que foram anotados no metagenoma para o metabolismo central, mas não foram anotados no metatranscriptoma poderiam ter apresentado resultados diferentes.

Após a análise geral dos dados, o passo seguinte foi a investigação dos genes relacionados às etapas de decomposição da matéria orgânica em ambiente anóxico. Neste contexto estão os fermentadores que utilizam como substratos açúcares (derivado dos polímeros de carboidratos), aminoácidos (derivados das proteínas) e glicerol (derivado dos lipídios). Os produtos da fermentação pelos fermentadores primários são lactato, etanol, formato, succinato, acetato e o gás hidrogênio ( $H_2$ ), sendo o mais produzido deles o  $H_2$  (MADIGAN *et al.*, 2010). Alguns desses produtos como succinato, lactato e etanol são substratos relativamente ricos e podem ser usados por outras bactérias chamadas de fermentadoras secundárias (MADIGAN *et al.*, 2010). Tanto os produtos dos fermentadores primários como secundários podem ser usados pelas bactérias metanogênicas e acetogênicas. Outros grupos de metabólicos anaeróbicos em ambientes naturais são bactérias redutoras de ferro férrico, redutoras de sulfato e as desnitrificantes. Sendo assim, os genes relacionados a todas essas etapas foram investigados.

Os genes relacionados à etapa inicial de degradação da matéria orgânica foram verificados para o metabolismo de carboidrato.

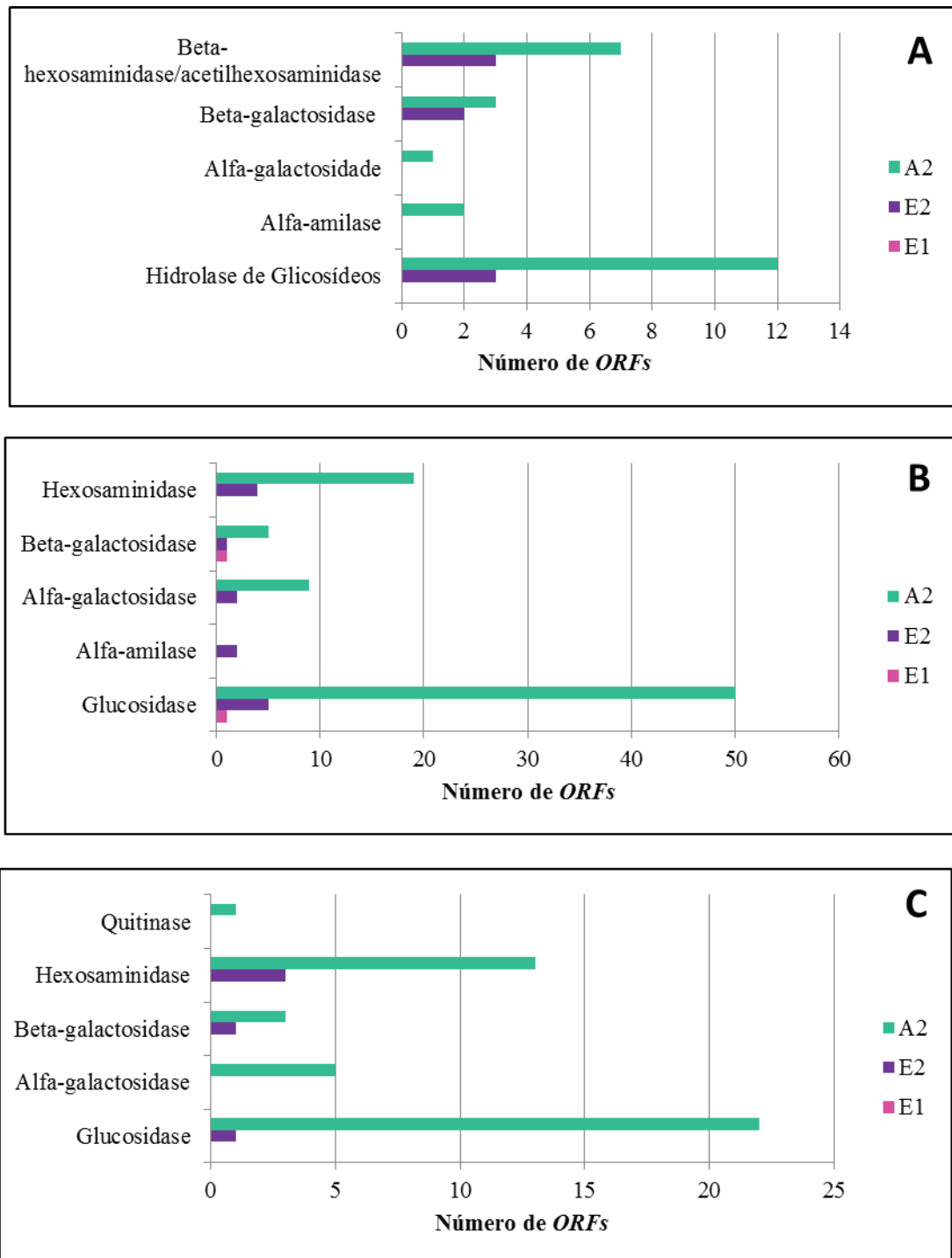
A anotação via COG anotou um número ligeiramente superior a anotação via UniProt50. Os genes encontrados para o metabolismo de carboidratos e lipídios via a anotação UniProt50 foram os mesmos genes encontrados via anotação COG, sendo assim os resultados apresentados serão focados na anotação do COG.

Na categoria de transporte e metabolismo de carboidratos as enzimas relacionadas a degradação de carboidrato foram identificadas e sua presença está ilustrada na figura 30. As *ORFs* relacionadas ao transporte de carboidrato também foram identificadas e os resultados se encontram na tabela 17. Também foram anotados genes para a gluconeogênese, ciclo do ácido cítrico (Figuras 27, 28 e 29) e da glicólise (tabela 18).

O metabolismo de carboidratos apresenta semelhanças e diferenças entre as regiões do intestino. As semelhanças consistem que em todas as regiões foram anotados genes para o catabolismo de carboidratos, glicólise, ciclo de Krebs e cadeia fosforilativa. As diferenças consistem num maior número e diversidade de hidrolases anotadas para as regiões posteriores de ambas as minhocas e uma diversidade superior de genes de transporte de carboidratos para as regiões anterior e média de *P. excavatus*.

As semelhanças no metabolismo de carboidratos sugerem que as comunidades microbianas das diferentes porções do intestino da minhoca possuem potencial funcional para a obtenção de energia tendo como fonte de carbono o carboidrato. Nas regiões anterior e média de *P. excavatus* existe uma diversidade de genes para o transporte de diversos carboidratos como manitol, maltose, sacarose, trealose, celobiose, alfa e beta glucósido e chitobiose (Figura 29). A não identificação de genes para uma grande diversidade de transportadores de carboidratos nas regiões posteriores de ambas as minhocas não deve indicar a falta dessa função nesta região uma vez que a informação pode ter sido perdida por falha na detecção durante o sequenciamento ou na montagem dos *contigs* ou pela baixa abundância destes genes nesta região. A anotação de diversas hidrolases responsáveis pela degradação de sacarose, celulose e quitina nessas regiões sugere que a região posterior do intestino tem potencial funcional para o processamento da matéria orgânica. Em contrapartida, nas regiões anterior e média de *P. excavatus* quase não teve hidrolases anotadas, é possível que essas diferenças encontradas entre as diferentes porções do intestino indiquem os estágios de digestão da matéria orgânica.

Os dados do metatranscriptoma para o metabolismo de carboidratos apenas anotou genes para o transportador de manitol, para a hidrolase beta-glucosidase e as enzimas gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e piruvato quinase da glicólise.



**Figura 30: Genes anotados para enzimas envolvidas na degradação de carboidrato. A) Anotação via COG. B) Anotação via KOALA. C) Anotação via KAAS. Fonte: autor (2018).**

**Tabela 17:** Transporte de carboidrato.

Transporte de Carboidrato	E1			E2			A2		
	COG	KOALA	KAAS	COG	KOALA	KAAS	COG	KOALA	KAAS
Celobiose	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Glucose	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lichena	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Chitobiose	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Trealose	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Alfa glicósido	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Beta glicósido	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ácido N-acetilmurânico	+	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetilglucosamina	+	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetil galactosamina	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Os sinais + e – significam presença e ausência do transportador, respectivamente.

**Tabela 18:** Enzimas da via glicolítica

Enzimas da via da glicólise	E1			E2			A2		
	COG	KOALA	KAAS	COG	KOALA	KAAS	COG	KOALA	KAAS
Hexoquinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfohexose-isomerase	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Fosfofrutoquinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aldolase	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Triose fosfato isomerase	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fosfogliceroquinase	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Fosfogliceromutase	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Enolase	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Piruvato quinase	-	+	+	+	+	-	+	+	+

Os sinais + e – significam presença e ausência da enzima, respectivamente.

As enzimas relacionadas às vias de fermentação em procariotos foram investigadas nos dados do metagenoma (Tabela 19). As regiões anterior e média de *P. excavatus* apenas apresentaram *ORFs* anotadas para o ramo acetato. As regiões posteriores de *P. excavatus* e *D. annae* tiveram *ORFs* para os ramos de acetato, etanol e formato. A via succinato ocorre em 4 etapas, sendo, o primeiro passo a carboxilação do fosfoenolpiruvato para oxaloacetato pela PEPC. A malato desidrogenase catalisa a conversão de oxaloacetato para malato que por sua vez será convertido a fumarato pela fumarase hidratase. A etapa final é realizada pela fumarato redutase. As regiões posteriores de ambas as espécies de minhocas possuem todas as enzimas da via do succinato. Além disso, as regiões posteriores apresentaram a Acetil-CoA sintetase, enzima primeiramente relatada apenas em eucariotos, sendo posteriormente encontrada em algumas arqueas. A região posterior de *D. annae* foi a única que teve *ORF* marcada para o via lactato.

**Tabela 19:** Enzimas participantes das vias fermentativas em procariotos.

Enzima	Produto final	Amostra E1	Amostra E2	Amostra A2
Lactato desidrogenase	Lactato	-	-	+
Álcool desidrogenase	Etanol	-	+	+
Formato desidrogenase	Formato	-	+	+
Formato C-acetiltransferase (piruvato formato liase)	Formato	-	-	+
Fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC)	Succinato	-	+	+
Malato desidrogenase	Succinato	-	+	+
Fumarase hidratase	Succinato	-	+	+
Fumarato redutase	Succinato	-	+	+
Fosfotransacetilase	Acetato	+	+	+
Acetato quinase	Acetato	+	+	+
Acetil CoA sintetase	Acetato	-	+	+

A amostra E1 corresponde às regiões anterior e média de *P. excavatus*, a amostra E2 a região posterior de *P. excavatus* e a amostra A2 a região posterior de *D. annae*. Os sinais + e - significam presença e ausência da enzima, respectivamente.

Os dados apresentados mostram que as regiões posteriores de ambas as espécies de minhocas possuem uma microbiota com potencial de realizar a etapa de fermentação usando diversas vias, porém as regiões anterior e média de *P. excavatus* apresentaram apenas genes para a via acetato (Tabela 19). As diferenças entre as porções do intestino de *P. excavatus* devem ser olhadas com cautela uma vez que a biblioteca das regiões anterior e média teve apenas metade das leituras da biblioteca da região posterior, havendo a possibilidade de os genes de outras vias estarem presentes, mas em menor quantidade. Consequentemente será necessária uma amostragem maior para realizar sua anotação. Apesar dessa ressalva, os dados obtidos apresentam evidência que as regiões anterior e média podem utilizar a via acetato como via para fermentação. O acetato produzido pela microbiota pode ser usado pela minhoca como recurso alimentar (DRAKE, HORN., 2007).

A investigação dos genes relacionados as vias fermentativas também foi realizada no metatranscriptoma (Tabela 20). Unindo os dados dos *contigs* do metatranscriptoma e as leituras do metatranscriptoma mapeados contra as *ORFs* da biblioteca da amostra E2 do metagenoma observou-se a anotação dos genes para a via do succinato.

Os dados do metagenoma mostram um potencial metabólico para várias vias fermentativas enquanto que os dados do metatranscriptoma mostram que a via do succinato está sendo transcrita no intestino de *P. excavatus*. Este resultado não implica que as demais vias de fermentação não são usadas pela microbiota da minhoca.

Diferentes condições geralmente implicam em diferenças na transcrição dos genes. Além disso, a anotação apenas para a via do succinato pode ter ocorrido porque esta via pode ser a que está mais ativa dentro das condições estudadas e a baixa amostragem nos dados do metatranscriptoma pode ter dificultado a verificação de outros genes transcritos em menor quantidade. O volume de informação obtido do sequenciamento global do DNA das amostras é muito maior que o obtido do metatranscriptoma, sendo assim é possível que seja necessário uma amostragem maior para a verificação dos genes sendo transcritos de outras vias fermentativas.

**Tabela 20: Enzimas das vias fermentativas**

Enzimas	Produto final	reads x contigs da amostra E1	reads x contigs da amostra E2	Contigs do metatranscriptoma
Lactato desidrogenase	Lactato	-	-	-
Álcool desidrogenase	Etanol	-	-	-
Formato desidrogenase	Formato	-	+	-
Formato C-acetiltransferase (piruvato formato liase)	Formato	-	-	-
Fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC)	Succinato	-	-	+
Malato desidrogenase	Succinato	-	-	+
Fumarase hidratase	Succinato	-	+	-
Fumarato redutase	Succinato	-	+	+
Fosfotransacetilase	Acetato	-	-	-
Acetato quinase	Acetato	+	+	-
Acetil CoA sintetase	Acetato	-	+	-

Os sinais + e – significam presença e ausência da enzima, respectivamente.

As vias associadas ao metabolismo de metano também foram verificadas. No entanto, não foram identificados os genes para metanogênese para amostras de *P. excavatus*, apenas dois genes foram anotados em *D. annae* (Figura 31) nos dados do metagenoma. Nos dados do metatranscriptoma não foi anotado nenhum gene para o metabolismo do metano. A dificuldade em anotar os genes para a metanogênese pode estar ligada a baixa abundância dos metanogênicos nas amostras (Tabela 21).





com o potencial metanogênico (*start*) do substrato. Neste mesmo trabalho, Bradley e colaboradores (2012) não encontram correlação entre a abundância do gene *mcrA* (metil coenzima M redutase, principal enzima da metanogênese) e as taxas de emissão de CH<sub>4</sub>.

No presente trabalho o gênero mais abundante nas amostras pertencentes às minhocas foi *Methanobrevibacter*, que se apresenta em quantidades baixíssimas (quase inexistente) nas amostras do substrato (Tabela 21). Este gênero tem sido documentado em intestino de humanos e bovinos (SAMUEL *et al*, 2007; LEAHY *et al*, 2010). O segundo gênero que mais apareceu nas amostras de minhocas foi um dos gêneros mais característicos de ruminantes, o *Methanobacterium* (BRADLEY *et al*, 2012), porém sua abundância dentro do intestino se manteve similar à encontrada no substrato, tendo apenas um ligeiro aumento na região anterior de *D. annae* e nas regiões anterior e média de *P. excavatus* (tabela 21). Outros metanogênicos se encontraram presentes no substrato e tiveram sua concentração mantida ou diminuída nas amostras das minhocas. O gênero *Methanobrevibacter* foi favorecido no intestino da minhoca, uma vez que foi o único com concentração aumentada (Tabela 21). Esses dados mostram claramente que os metanogênicos ingeridos pela minhoca sofrem uma seleção por ela, e assim, mesmo que seja necessário um *start* por parte do material ingerido pela minhoca para favorecer a atividade de metanogênese no intestino, a contribuição do substrato é também selecionada pela ação da minhoca.

**Tabela 21:** Metanogênicos presentes nas amostras do substrato e das duas espécies de minhocas.

Gênero	Substrato	<i>D. annae</i>				<i>P. excavatus</i>			
		Anterior	Média	Posterior	Coprólito	Anterior	Média	Posterior	Coprólito
<i>Methanobacterium</i>	0,02	0,02	0,05	0,01	0,02	0,07	0,06	0,01	0,02
<i>Methanobrevibacter</i>	0,00	1,19	0,61	0,32	0,14	0,65	0,75	0,11	0,09
<i>Methanosphaera</i>	0,00	0,02	0,01	0,01	0,00	0,02	0,03	0,00	0,00
<i>Methanocorpusculum</i>	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
<i>Methanoculleus</i>	0,00	0,00	0,05	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Methanomicrobiales archaeon</i> (não cultivável)	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Methanosaeta</i>	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Methanosarcina</i>	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Methanomassiliicoccus</i>	0,00	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00

Análise de avaliação taxonômica de 16S rDNA realizadas no servidor QIIME. Dados referentes à abundância relativa (%).

Os genes relacionados a via Wood-Ljungdahl foram verificados nos dados do metagenoma e os resultados se encontram na tabela 22. O principal gene utilizado para a prospecção desse grupo de bactérias é para a enzima formil tetrahidrofolato sintetase

(FTHFS) (DENMAN *et al.*, 2015). Este gene foi encontrado nas regiões anterior e média de *P. excavatus* e região posterior de *D. annae*, apesar desse gene não ter sido anotado para a região posterior de *P. excavatus*. Para todas as regiões não foi anotado o gene para enzima que realiza a última etapa do ramo metil e nem a enzima para o ramo carbonila. As vias para acetogênese também foram verificadas no metatranscriptoma (Figura 23), apenas quatro enzimas relacionadas a via Wood-Ljungdal foram anotadas.

Bactérias acetogênicas são encontradas nos intestinos de ruminantes, humanos, cupins e minhocas. As bactérias *Sporomusa termitida* e *Acetonema longum* são acetogênicas isoladas de intestino de cupim (BOGA, BRUNE, 2002). O gênero *Acetonema* não foi encontrado em nenhuma amostra de minhocas, e o gênero *Sporomusa* foi encontrado em baixíssima concentração. Outro gênero encontrado em cupim é o *Treponema*, o qual também foi encontrado em baixa concentração em algumas porções do intestino (Tabela 24). Outra bactéria acetogênica é a *Holophaga foetida* do filo acidobacteria, mas este gênero não foi encontrado no presente trabalho, apesar da ordem Holophagae ter sido anotada para todas as amostras. No intestino de ruminantes e humanos tem sido isoladas bactérias do gênero *Clostridium*, e nas amostras do presente trabalho encontrou-se a bactéria *Clostridium sensu stricto* (Tabela 24) pertencente a este gênero. Em minhocas, o acetogênico *Clostridium glycolicum* aumentou em intestino de *E. eugeniae* e *Lumbricus terrestris* suplementado com glucose (WÜST, HORN, DRAKE., 2011; SCHULZ *et al.*, 2015).

**Tabela 22:** Enzimas da via Wood-Ljungdahl.

Via Wood-Ljungdahl - Enzimas	Amostra E1	Amostra E2	Amostra A2
Piruvato ferredoxina oxidoreductase	-	+	+
Acetil-CoA sintetase	-	+	+
Fosfotransacetilase	+	+	+
Acetato quinase	+	+	+
Braço metil (Eastern)			
Formato desidrogenase	-	+	+
Formil tetrahydrofolato sintetase	+	-	+
Formil tetrahydrofolato ciclohidrolase	+	+	+
Metil tetrahydrofolato desidrogenase	+	+	+
Metil tetrahydrofolato reductase	-	+	+
Metil transferase	-	-	-
Braço carbonila (Western)			
Monóxido de carbono desidrogenase	-	-	-

Os sinais + e – significam presença e ausência da enzima, respectivamente.

**Tabela 23:** Via Wood-Ljungdahl

Via Wood-Ljungdahl - Enzimas	leituras x <i>contigs</i> da amostra E1	leituras x <i>contigs</i> da amostra E2	<i>Contigs</i> do metatranscriptoma
Piruvato ferredoxina oxidoreductase	-	+	+
Fosfotransacetilase	-	-	-
Acetato quinase	+	-	-
Braço metil (Eastern)			
Formato desidrogenase	-	+	-
Formil tetrahydrofolato sintetase	-	-	-
Formil tetrahydrofolato ciclohidrolase	-	-	-
Metil tetrahydrofolato desidrogenase	-	-	-
Metil tetrahydrofolato reductase	-	-	-
Metil transferase	-	-	-
Braço carbonila (Western)			
Monóxido de carbono desidrogenase	-	-	-

Os sinais + e – significam presença e ausência da enzima, respectivamente. *Contig* é um conjunto de segmentos de DNA (leituras) sobrepostos.

**Tabela 24: Acetogênicos presentes nas amostras do substrato e das duas espécies de minhocas.**

Filo - Classe - Ordem - Família - Gênero	<i>P. excavatus</i>				Substrato
	Anterior	Média	Posterior	Coprólito	
Firmicutes - Negativicutes - Selenomonadales - Veillonellaceae - <i>Sporomusa</i>	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Spirochaetae - Spirochaetes - Spirochaetales - Spirochaetaceae - <i>Treponema</i>	0,0043	0,0000	0,0000	0,0000	0,3016
Acidobacteria - Holophagae - Subgroup 10	0,0252	0,0003	0,0001	0,0002	0,0329
Acidobacteria - Holophagae - Subgroup 7	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0112
Firmicutes - Clostridia - Clostridiales - Clostridiaceae - <i>Clostridium sensu stricto</i>	0,0568	0,0007	0,0001	0,0001	0,0064
Filo - Classe - Ordem - Família - Gênero	<i>D. annae</i>				Substrato
	Anterior	Média	Posterior	Coprólito	
Firmicutes - Negativicutes - Selenomonadales - Veillonellaceae - <i>Sporomusa</i>	0,0008	0,0013	0,0005	0,0000	
Spirochaetae - Spirochaetes - Spirochaetales - Spirochaetaceae - <i>Treponema</i>	0,0077	0,0043	0,0002	0,0015	
Acidobacteria - Holophagae - Subgroup 10	0,0141	0,0029	0,0163	0,0061	
Acidobacteria - Holophagae - Subgroup 7	0,0000	0,0000	0,0035	0,0015	
Firmicutes - Clostridia - Clostridiales - Clostridiaceae - <i>Clostridium sensu stricto</i>	0,0948	0,0977	0,0411	0,0354	

Análise de avaliação taxonômica de 16S rDNA realizadas no servidor QIIME. Dados referentes à abundância relativa (%).

Os acetogênicos são considerados metabolicamente não significantes no intestino de minhoca assim como os metanogênicos. No entanto, este grupo bacteriano faz parte da comunidade bacteriana do intestino da minhoca e deve contribuir em certo grau para a mineralização da matéria orgânica. Mesmo que a porção atribuída a essas bactérias seja pequena para o consumo de  $H_2$  ainda assim é importante realizar mais estudos sobre elas para entender como um todo a mineralização da matéria orgânica realizada pelas minhocas assim como a sua contribuição para o ciclo do carbono. Os acetogênicos são encontrados em diversos ambientes onde ocorre a mineralização da matéria orgânica e sua contribuição para esses sistemas ainda não é bem entendida. Além disso, a participação dos acetogênicos assim como os outros grupos bacterianos que participam da competição pelo  $H_2$  é afetada pelas condições ambientais. Em ruminantes tem se explorado a dinâmica dessas relações para promover o aumento da participação dos acetogênicos e assim aumentar a produção de acetato que pode ser usado pelo hospedeiro e também para competir com os metanogênicos e reduzir a produção de metano (LOPEZ *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2015).

As vias associadas ao metabolismo de nitrogênio nas diferentes regiões do intestino também foram verificadas. Em todas as amostras foram encontrados genes para o metabolismo dissimilativo da redução do nitrato (Figuras 32, 33 e 34). Nas regiões posteriores de ambas as espécies foram encontrados genes para o metabolismo assimilativo da redução do nitrato (Figuras 33 e 34) e na região posterior de *D. annae* genes para a nitrificação (Figura 34). Os genes *narG*, *nirK* e *nosZ* são usados para estimar

as bactérias desnitrificantes e o gene *narG* para as redutoras de nitrato dissimilatórias. O presente trabalho não anotou nenhuma *ORF* para os genes da via de desnitrificação, mas anotou todos os genes para a via de dissimilação do nitrato, incluindo *narG*.

Trabalhos têm mostrado evidências de produção de  $N_2O$  e  $N_2$  por diversas espécies de minhocas, incluindo a *P. excavatus* e *D. annae* (DEPKAT-JAKOB *et al.*, 2013). Nesses trabalhos o aumento da produção de  $N_2O$  pela adição de acetileno (inibidor da enzima da última etapa da desnitrificação) indica que a produção de  $N_2O$  e  $N_2$  pelas minhocas é devido à atividade de desnitrificação. No entanto, nenhum gene para a desnitrificação foi anotado nas amostras estudadas neste trabalho. Possivelmente a dificuldade em anotar estes genes se deva à baixa abundância das bactérias da via da desnitrificação. Na tabela 23 consta a relação dos gêneros encontrados nas amostras que podem ter os genes vinculados com o ciclo do nitrogênio. Observou-se uma baixa abundância dos gêneros com genes para a desnitrificação. A baixa abundância dos gêneros que possuem bactérias desnitrificantes e consequentemente a baixa abundância dos genes não significa que estas bactérias não sejam importantes para a mineralização da matéria orgânica no intestino da minhoca. A abundância também não reflete baixa atividade dessas bactérias e baixa produção de  $N_2O$  e  $N_2$ . Em cupins de diferentes hábitos alimentares (madeira, grama, solo, fungo) a abundância dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* não teve relação com os níveis de  $N_2O$  (BRAUMAN *et al.*, 2015).

A baixa abundância para as bactérias redutoras de nitrato dissimilatórias também ocorre para a maioria dos gêneros com exceção do gênero *Vibrio* na região anterior de *P. excavatus* e *Enterobacter* para a região posterior de *P. excavatus* (tabela 25).

Apesar da produção de  $N_2O$  e  $N_2$  ser atribuída principalmente às bactérias desnitrificantes, outros processos podem contribuir para a emissão desses gases. Bactérias redutoras de nitrato podem produzir NO por reações inespecíficas de nitrato redutase e depois o NO é desintoxicado para  $N_2O$  (DEPKAT-JAKOB *et al.*, 2013). Outros processos que também contribuem com a produção de  $N_2O$  como a redução assimilatória do nitrato e a nitrificação, e genes para ambos os processos foram identificados na região posterior de *D. annae* e genes para a redução assimilatória do nitrato na região posterior de *P. excavatus*. Em ruminantes a produção primária de  $N_2O$  tem sido associada à redução de nitrato a amônia. Um estudo mostrou que os redutores de nitrato dissimilatórios cultivados superaram os denitrificadores cultivados em conteúdo intestinal, sugerindo uma competição pelo nitrato entre essas bactérias (DEPKAT-

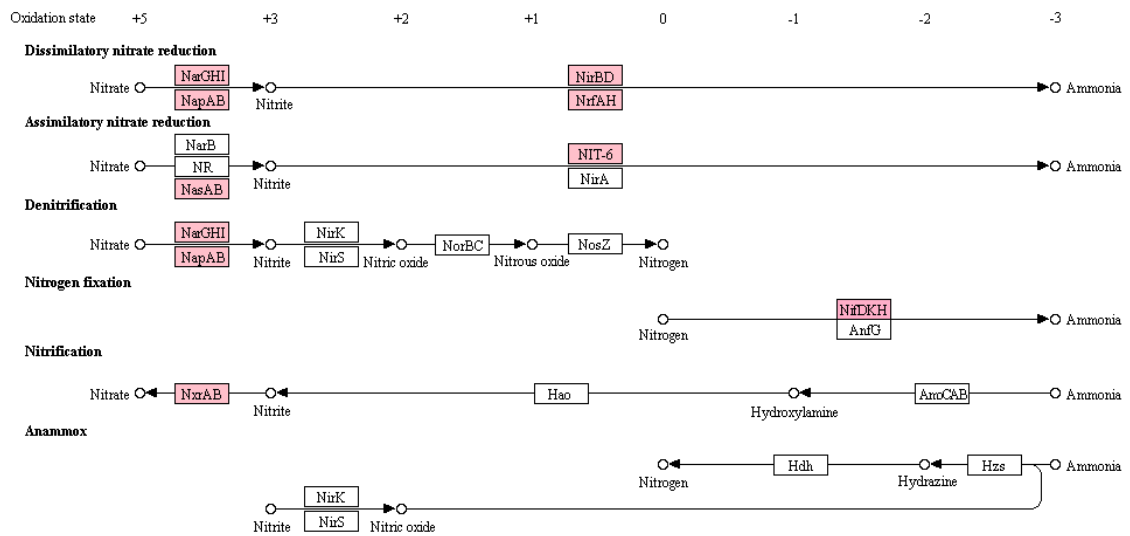
JAKOB *et al.*, 2010). Sendo assim, seria interessante investigar a produção de N<sub>2</sub>O por outras vias além da desnitrificação e assim avaliar a contribuição das diferentes vias para a produção de N<sub>2</sub>O. Além disso, foco sobre a produção de N<sub>2</sub> para a investigação do fluxo de elétrons nas diferentes vias é considerada conservadora uma vez que não considera a amonificação. Em cupins a amonificação é sete vezes mais alta que a desnitrificação, e apesar disso, tanto a amonificação como a desnitrificação têm sido consideradas marginais no processo de mineralização (NGUGI; BRUNE, 2012).

O estudo das vias relacionadas ao ciclo do nitrogênio é importante no entendimento de como ocorre a mineralização da matéria orgânica no intestino das minhocas. Além disso, dentro de panorama maior a produção de N<sub>2</sub> e amônia pelas minhocas pode desempenhar um papel chave no ciclo do nitrogênio terrestre (DRAKE; SCHRAMM; HORN, 2006).

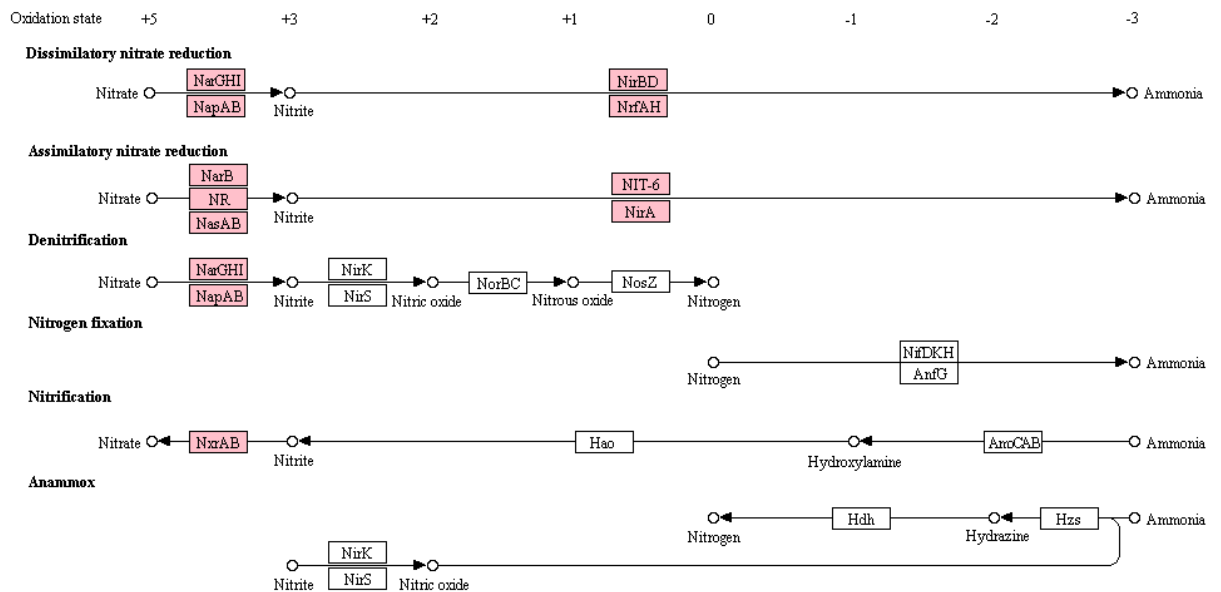
**Tabela 25:** Bactérias relacionadas ao ciclo do nitrogênio presentes nas amostras do substrato e das amostras provenientes das duas espécies de minhocas.

Filo - Gênero	Substrato	<i>D. annae</i>				<i>P. excavatus</i>			
		Anterior	Média	Posterior	Coprólito	Anterior	Média	Posterior	Coprólito
<b>Desnitrificantes/Redutoras de nitrato dissimulatórias</b>									
Proteobacteria - <i>Pseudomonas</i>	1,4018	0,1016	0,4761	0,9412	0,6804	0,7967	0,6611	1,1737	1,5007
Firmicutes - <i>Bacillus</i>	0,9982	0,2672	0,1306	0,4371	0,7688	0,1667	0,0453	0,0172	0,0527
<b>Desnitrificantes</b>									
Firmicutes - <i>Lactobacillus</i>	0,0141	0,0051	0,0008	0,0005	0,0000	0,0584	0,0174	0,0563	0,0022
Proteobacteria - <i>Xanthomonas</i>	0,0084	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0025	0,0006	0,0000	0,0045
Proteobacteria - <i>Gluconobacter</i>	0,0120	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Proteobacteria - <i>Acinetobacter</i>	0,6104	0,1196	0,0136	0,0415	0,0683	0,0716	2,1429	0,0071	0,0022
Bacteroidetes - <i>Flavobacterium</i>	0,1139	0,0023	0,0358	0,1345	0,0795	0,1298	0,2162	1,2378	0,2571
Proteobacteria - <i>Paracoccus</i>	0,2166	0,0164	0,0580	0,0144	0,0488	0,1619	0,0339	0,0000	0,0389
Actinobacteria - <i>Corynebacterium</i>	0,0575	0,1610	0,5189	0,0639	0,2234	0,3096	0,0809	0,0116	0,0412
<b>Redutoras de nitrato dissimulatórias</b>									
Proteobacteria - <i>Neisseria</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0029	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000
Proteobacteria - <i>Desulfovibrio</i>	0,3450	0,0090	0,0390	0,0516	0,1243	0,0664	0,0250	0,0141	0,0584
Proteobacteria - <i>Klebsiella</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000
Proteobacteria - <i>Enterobacter</i>	0,0174	0,0000	0,0055	0,0002	0,0131	0,0044	0,1020	45,1079	0,2173
Proteobacteria - <i>Serratia</i>	0,0250	0,0000	0,0000	0,0018	0,0000	0,0000	0,0063	0,0068	0,0000
Proteobacteria - <i>Vibrio</i>	0,1566	0,0037	0,0000	0,0036	0,0000	9,4565	0,0006	0,1198	0,0000
<b>Nitrificantes</b>									
Proteobacteria - <i>Nitrosomonas</i>	0,0091	0,0037	0,0016	0,0066	0,0085	0,0000	0,0064	0,0108	0,0211
<b>Fixadoras de nitrogênio</b>									
Proteobacteria - <i>Methylobacterium</i>	0,0832	0,0110	0,0016	0,0009	0,0055	0,0043	0,0050	0,0000	0,0045
Proteobacteria - <i>Azospirillum</i>	0,0312	0,0060	0,0048	0,0042	0,0173	0,0177	0,0158	0,0023	0,0161
Proteobacteria - <i>Herbaspirillum</i>	0,0071	0,0119	0,0123	0,0007	0,0000	0,0019	0,0006	0,0000	0,0000
Proteobacteria - <i>Klebsiella</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000
Proteobacteria - <i>Rhodospirillum</i>	0,0015	0,0000	0,0000	0,0005	0,0045	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Proteobacteria - <i>Derxia</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000
Proteobacteria - <i>Bradyrhizobium</i>	0,0213	0,0726	0,0294	0,0172	0,0299	0,0383	0,0441	0,0187	0,0543
Proteobacteria - <i>Mesorhizobium</i>	0,2014	1,1436	0,8472	0,6792	1,0379	1,4728	1,2377	0,2873	1,1950

Análise de avaliação taxonômica de 16S rDNA realizadas no servidor QIIME. Dados referentes à abundância relativa (%).

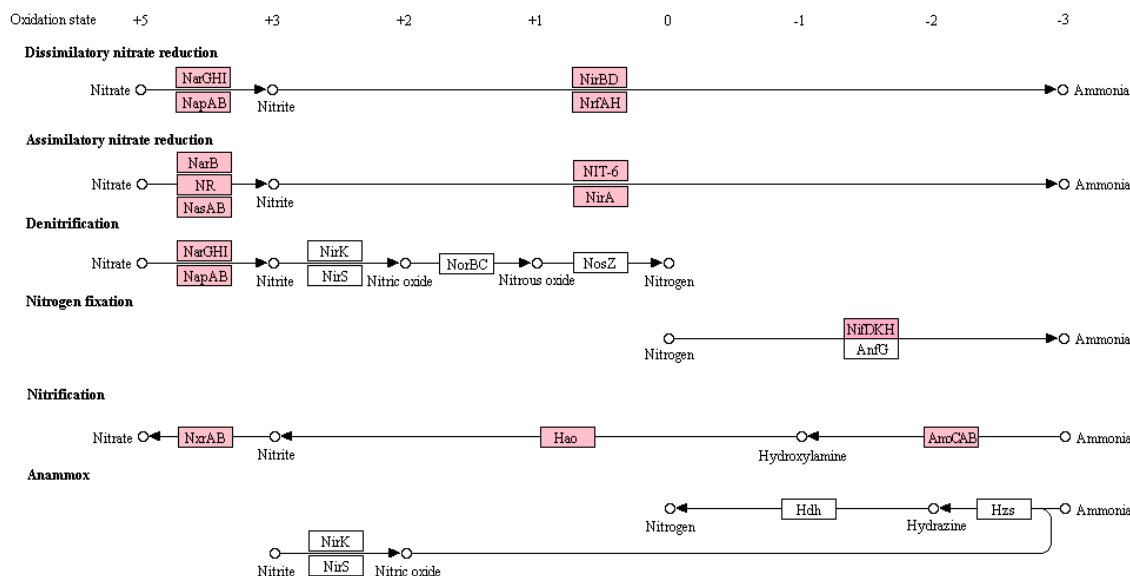


**Figura 32: Metabolismo do nitrogênio das regiões anterior e média de *P. excavatus*.** A anotação funcional das *ORFs* geradas pelo prodigal foi realizada utilizando o banco de dados do KEGG via KOALA. As vias metabólicas foram mapeadas utilizando o banco de dados de modulo do KEGG. Fonte: autor (2018).



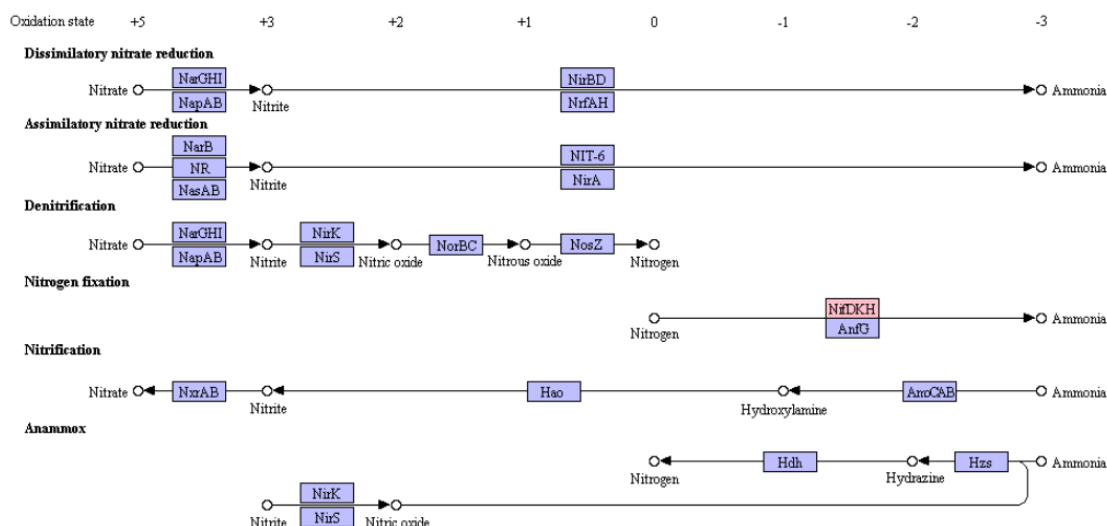
**Figura 33: Metabolismo do nitrogênio da região posterior de *P. excavatus*.** A anotação funcional das *ORFs* geradas pelo prodigal foi realizada utilizando o banco de dados do KEGG via KOALA. As vias metabólicas foram mapeadas utilizando o banco de dados de modulo do KEGG. Fonte: autor (2018).





**Figura 34: Metabolismo do nitrogênio da região posterior de *D. annae*.** A anotação funcional das ORFs geradas pelo prodigal foi realizada utilizando o banco de dados do KEGG via KOALA. As vias metabólicas foram mapeadas utilizando o banco de dados de modulo do KEGG. Fonte: autor (2018).

As vias relacionadas ao ciclo do nitrogênio também foram verificadas nos dados do metatranscriptoma, e verificou-se que apenas a enzima nitrogenase (NifDKH) foi anotada (Figura 34), indicando a presença de diazotrofos no intestino da minhoca.



**Figura 35: Ciclo do nitrogênio em *P. excavatus*.** As leituras anotadas do metatranscriptoma para a amostra do intestino de *P. excavatus* se encontram marcadas em rosa. A anotação funcional foi realizada utilizando o banco de dados do KEGG via KOALA. As vias metabólicas foram mapeadas utilizando o banco de dados de modulo do KEGG. Fonte: autor (2018).

A fixação biológica do nitrogênio é o primeiro passo do ciclo do  $N_2$ . A nitrogenase é responsável pela redução do nitrogênio a amônia (NELSON, COX., 2006).

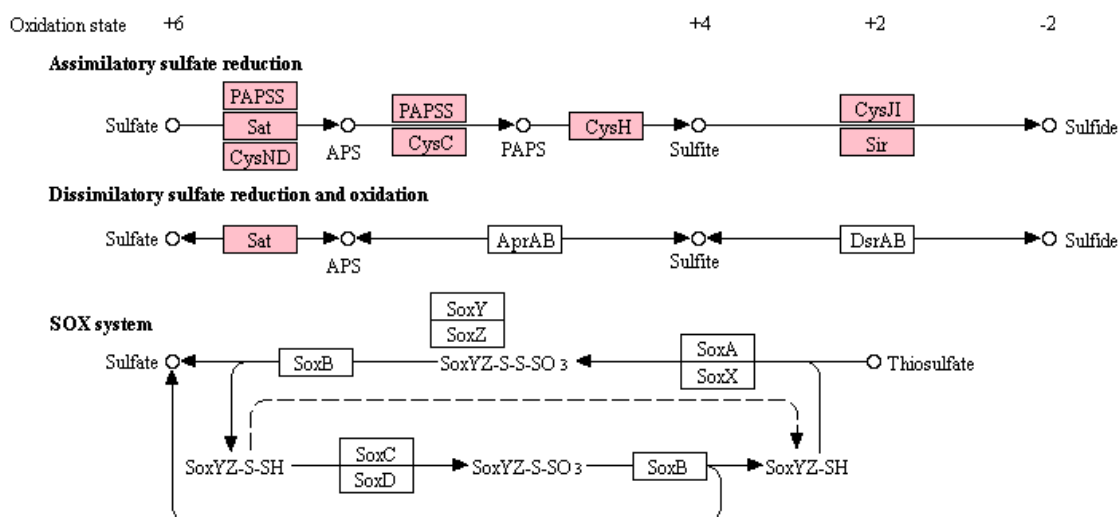
São encontradas três nitrogenases: uma contendo molibdênio e ferro (a mais comum) e outras contendo vanádio ou ferro. São indicadas como Mo-nitrogenase, V-nitrogenase ou Fe-nitrogenase (NELSON; COX, 2006). Em ambas as espécies de minhocas foi anotado o gene *nifD* da Mo-nitrogenase (Figuras 32 e 34).

A presença de diazotrofos no ambiente intestinal é pouco explorada. Apesar de diazotrofos como *Clostridium beijerinckii*, *C. kluyveri*, *C. thermocellum*, *C. butyricum*, *C. cellulolyticum* e *Ruminococcus flavefaciens* terem sido identificados em intestino humano, não foi determinado se a fixação de nitrogênio ocorre neste ambiente (MOIR, 2011). Em insetos, a atividade de fixação do nitrogênio foi demonstrada em larvas e adultos do besouro *Dendroctonus valens*, embora nenhuma bactéria fixadora de N<sub>2</sub> tenha sido isolada (JIMÉNEZ *et al.*, 2009). A formiga *Tetraponera* possui simbiontes relacionados a bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> de nódulo de plantas, os grupos identificados foram: *Rhizobium*, *Methylobacterium*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* (BORM *et al.*, 2002). Em cupins, a espécie *Neotermes Koshunensis* teve a atividade de fixação do N<sub>2</sub> detectada e a expressão do gene *nifH* foi verificada (NODA *et al.*, 1999). Em minhocas, a bactéria *Clostridium glycolicum* foi encontrada em *P. corethrurus* e tem sido associada a possível fixação de nitrogênio (BAROIS *et al.*, 1987). A importância da fixação biológica do nitrogênio em intestino de insetos tem sido associada a uma dieta pobre em nitrogênio (NODA *et al.*, 1999; BORM *et al.*, 2002; JIMÉNEZ *et al.*, 2009).

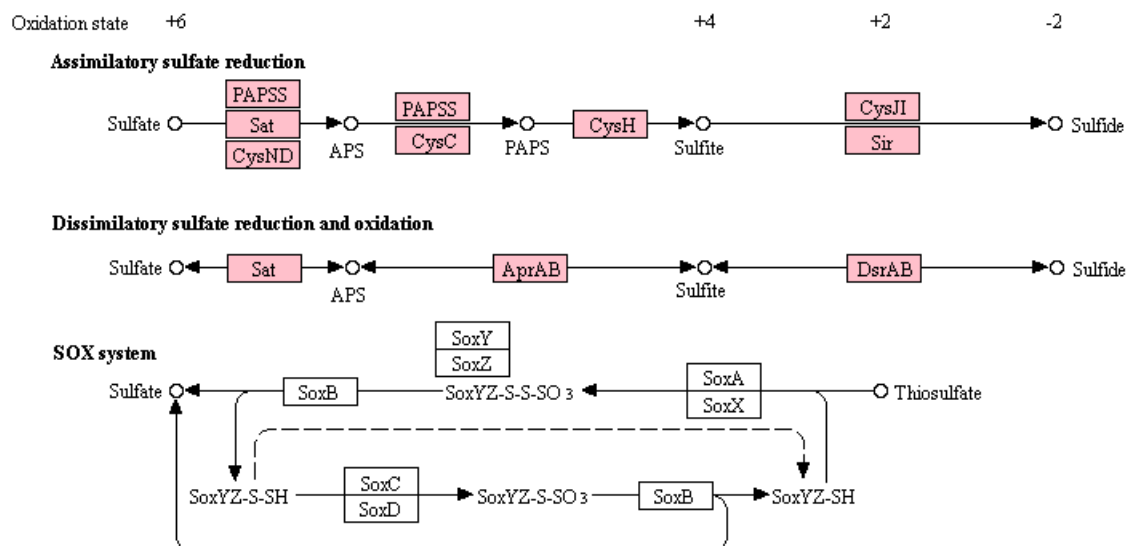
As bactérias encontradas nos intestinos de inseto foram verificadas nos dados da biodiversidade do presente trabalho. A única bactéria do gênero *Clostridium* encontrada foi *Clostridium sensu stricto*, os gêneros *Rhizobium*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* não foram anotados e o gênero *Methylobacterium* foi anotado em baixa abundância (Tabela 25). Outras bactérias fixadoras de nitrogênio foram observadas (Tabela 25), o gênero que se destacou com maior abundância foi o gênero *Mesorhizobium*, na região posterior há uma queda na abundância desse gênero.

O potencial funcional para a redução do sulfato foi também avaliado, e nas duas espécies de minhocas foram encontrados genes para o metabolismo assimilativo (Figuras 36 e 37). Somente na região posterior de *D. annae* encontraram-se genes para o metabolismo dissimilativo (Figura 37). Na tabela 26 consta a relação das famílias encontradas nas amostras que possuem genes para a redução do sulfato. A maior parte das famílias se encontram presentes em quantidades extremamente baixas. As famílias com maior abundância foram Desulfobulbaceae, Desulfomicrobiaceae e

Desulfovibrionaceae, estando mais presentes nas amostras de *D. annae*, o que poderia explicar porque somente nesta espécie de minhoca foram achados genes para a redução dissimilativa do sulfato.



**Figura 36: Metabolismo do sulfato das regiões anterior, média e posterior de *P. excavatus*.** Os genes anotados para a amostra das regiões anterior e média de *P. excavatus* se encontram marcados em rosa. A anotação funcional das ORFs geradas pelo prodigal foi realizada utilizando o banco de dados do KEGG via KOALA. As vias metabólicas foram mapeadas utilizando o banco de dados de modulo do KEGG. Fonte: autor (2018).



**Figura 37: Metabolismo do sulfato da região posterior de *D. annae*.** Os genes anotados para a amostra da região posterior de *D. annae* se encontram marcados em rosa. A anotação funcional das ORFs geradas pelo prodigal foi realizada utilizando o banco de dados do KEGG via KOALA. As vias metabólicas foram mapeadas utilizando o banco de dados de modulo do KEGG. Fonte: autor (2018).

**Tabela 26:** Bactérias redutoras de sulfato encontradas nas amostras do substrato e das duas espécies de minhoca.

Classe - Ordem - Família	<i>P. excavatus</i>				Substrato
	Anterior	Média	Posterior	Coprólito	
Deltaproteobacteria - Desulfarculales - Desulfarculaceae	0,00	0,00	0,00	0,03	0,01
Deltaproteobacteria - Desulfobacterales - Desulfobacteraceae	0,01	0,00	0,01	0,02	0,10
Deltaproteobacteria - Desulfobacterales - Desulfobulbaceae	0,22	0,06	0,01	0,14	0,83
Deltaproteobacteria - Desulfobacterales - Nitrospinaceae	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
Deltaproteobacteria - Desulfovibrionales - Desulfomicrobiaceae	0,00	0,00	0,01	0,05	1,94
Deltaproteobacteria - Desulfovibrionales - Desulfovibrionaceae	0,02	0,02	0,01	0,06	0,38
Deltaproteobacteria - Desulfurellales - Desulfurellaceae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Deltaproteobacteria - Desulfuromonadales - AKYG597	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Deltaproteobacteria - Desulfuromonadales - Desulfuromonadaceae	0,00	0,00	0,00	0,03	0,08
Deltaproteobacteria - Desulfuromonadales - GR-WP33-58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
Deltaproteobacteria - Desulfuromonadales - Geobacteraceae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
Deltaproteobacteria - Desulfuromonadales - Sva1033	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Deltaproteobacteria - Desulfuromonadales - Outra	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Classe - Ordem - Família	<i>D. annae</i>			
	Anterior	Média	Posterior	Coprólito
Deltaproteobacteria - Desulfarculales - Desulfarculaceae	0,00	0,00	0,00	0,00
Deltaproteobacteria - Desulfobacterales - Desulfobacteraceae	0,00	0,02	0,01	0,08
Deltaproteobacteria - Desulfobacterales - Desulfobulbaceae	0,95	1,06	0,92	1,07
Deltaproteobacteria - Desulfobacterales - Nitrospinaceae	0,00	0,00	0,00	0,00
Deltaproteobacteria - Desulfovibrionales - Desulfomicrobiaceae	0,00	0,18	0,27	0,58
Deltaproteobacteria - Desulfovibrionales - Desulfovibrionaceae	0,01	0,04	0,05	0,12
Deltaproteobacteria - Desulfurellales - Desulfurellaceae	0,00	0,00	0,00	0,00
Deltaproteobacteria - Desulfuromonadales - AKYG597	0,00	0,00	0,00	0,00
Deltaproteobacteria - Desulfuromonadales - Desulfuromonadaceae	0,00	0,00	0,04	0,14
Deltaproteobacteria - Desulfuromonadales - GR-WP33-58	0,00	0,00	0,00	0,00
Deltaproteobacteria - Desulfuromonadales - Geobacteraceae	0,00	0,00	0,01	0,01
Deltaproteobacteria - Desulfuromonadales - Sva1033	0,00	0,00	0,00	0,00
Deltaproteobacteria - Desulfuromonadales - Outra	0,00	0,00	0,00	0,00

Análise de avaliação taxonômica de 16S rDNA realizadas no servidor QIIME. Dados referentes a abundância relativa (%).

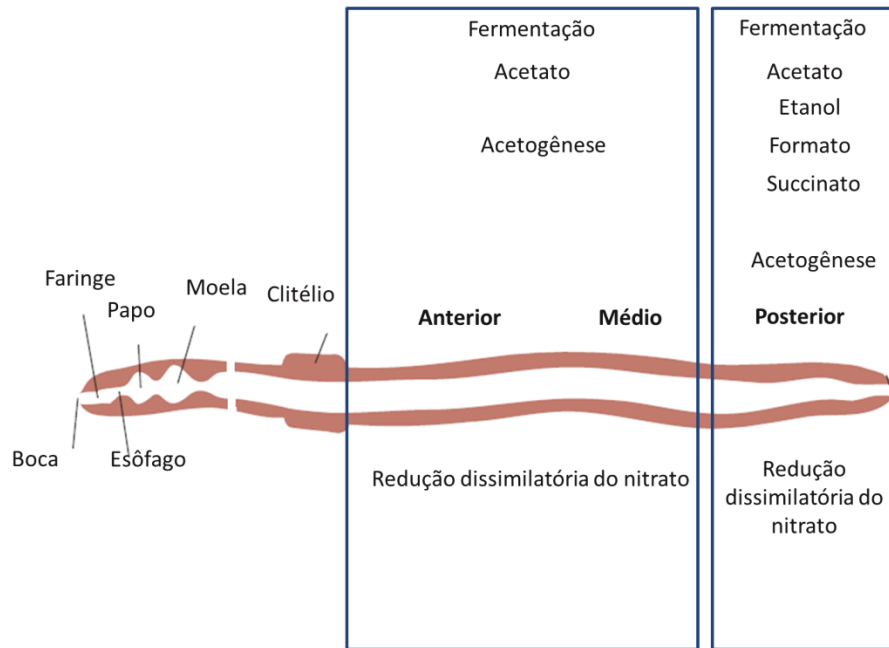
O formato produzido na fermentação é convertido em gás carbônico e hidrogênio, e caso o intestino do hospedeiro abrigue bactérias metanogênicas, estas bactérias podem reduzir CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> em metano e água. No entanto, outras rotas podem ser usadas para a remoção de H<sub>2</sub>, e uma das alternativas é a redução de sulfato pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS) (GIBSON, MACFARLANE, CUMMING, 1993). A oxidação de H<sub>2</sub> pelas bactérias redutoras de sulfato é termodinamicamente mais favorável ( $\Delta G^0 = -152.2$  kJ/mol) que pelas bactérias metanogênicas ( $\Delta G^0 = -131$  kJ/mol), o que poderia conferir certa vantagem na competição; porém as BRSs são dependentes da disponibilidade de sulfato, fazendo com que a dieta seja um fator chave na competição entre estes dois

grupos de bactérias (GIBSON, MACFARLANE, CUMMING, 1993; KUHNIGK *et al*, 1996). Em cupins, a abundância das BRSs chegou a ser similar a algumas enterobactérias e espécies de gram-positivas dependendo da dieta (KUHNIGK *et al*, 1996). O grupo das SBRs ainda é pouco estudado e tem sido encontrado no intestino de cupins, humanos e ruminantes. Os dados aqui apresentados mostram a possibilidade desse grupo na microbiota da minhoca.

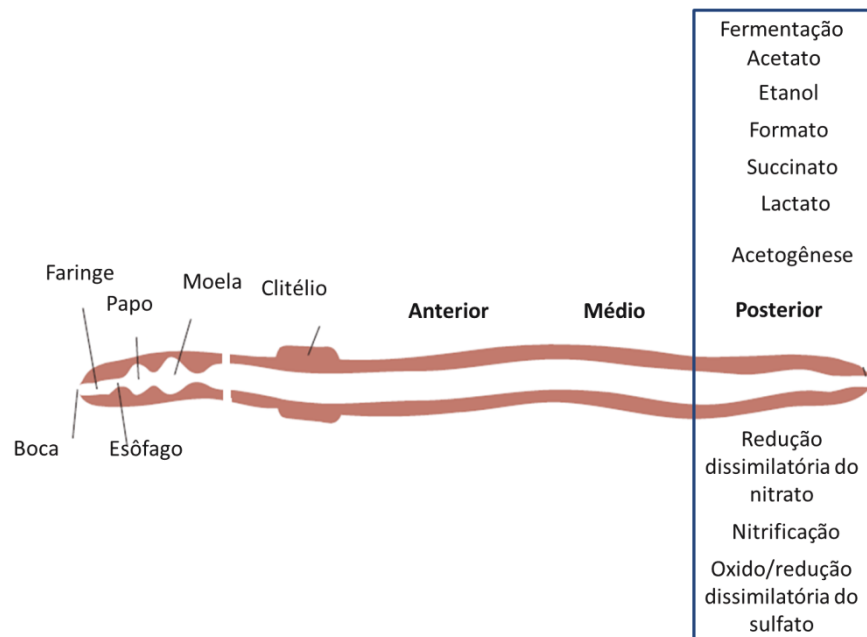
A investigação das BRSs no intestino da minhoca pode ajudar tanto no melhor entendimento da digestão da matéria orgânica pela minhoca como para um melhor entendimento das BRSs.

Os dados encontrados neste trabalho mostram evidências que a mudança na comunidade microbiana durante o transito no intestino é refletida no potencial funcional da comunidade. De maneira geral todas as regiões do intestino apresentaram genes para o metabolismo central (carboidrato, lipídios, proteínas, DNA e RNA), mas a abundância desses genes mudou dependendo da região do intestino de *P. excavatus*. Em relação à abundância dos genes, a região posterior de *P. excavatus* é mais similar à região posterior de *D. annae* do que as regiões anterior e média. Apesar da semelhança entre as regiões posteriores das minhocas, existe diferença na diversidade bacteriana que compõem as comunidades de cada espécie de minhoca. Em *P. excavatus* existe uma alta abundância das enterobactérias, e a dominância desse grupo pode ser refletida na menor abundância de outros grupos como acontece com as bactérias redutoras de sulfato. Essas diferenças podem afetar como cada minhoca e sua microbiota realizam a mineralização da matéria orgânica. Com base nesses resultados apresentamos um modelo hipotético do potencial metabólico para o processamento da matéria orgânica nas minhocas *P. excavatus* (Figura 38) e *D. annae* (Figura 39). Ambas as espécies são do grupo ecológico das epigêicas (se alimentam de resíduos orgânicos nos estágios primários e intermediários de decomposição e vivem na serapilheira do solo). No entanto, os hábitos alimentares das anécicas (se alimentam de resíduos orgânicos nos estágios intermediários e vivem em galerias permanentes nas camadas mais profundas do solo) e das endogêicas (se alimentam de grandes quantidades de solo mineral e vivem preferencialmente em solo) podem apresentar processos diferentes ao longo do canal alimentar. Todavia os modelos servem para ilustrar as diferenças espaciais entre os processos anaeróbicos que poderiam ocorrer durante a passagem da matéria orgânica no intestino. Um modelo hipotético para a minhoca anécica *Lumbricus terrestris* mostra que a região anterior do intestino possui

como vias principais de fermentação as vias do ácido láctico e ácido propiônico enquanto que as regiões média e posterior teriam as vias da fermentação de aminoácidos e do butirato mais ativas (WÜST, HORN, DRAKE, 2009). Neste outro modelo é possível verificar diferenças espaciais entre os processos anaeróbicos.



**Figura 38: Modelo hipotético das atividades anaeróbicas no intestino de *P. excavatus*.** O modelo mostra o potencial metabólico das vias anaeróbicas. Fonte: Drake; Horn, 2007-adaptado.



**Figura 39: Modelo hipotético das atividades anaeróbicas no intestino posterior de *D. annae*.** O modelo mostra o potencial metabólico das vias anaeróbicas. Fonte: Drake; Horn, 2007-adaptado.

O metagenoma permite a verificação do potencial genético da população presente em determinado ambiente, mas não significa que os genes encontrados estão sendo expressos e, portanto são necessários mais estudos para verificar quais genes estão realmente envolvidos com a digestão da matéria orgânica. Esses estudos devem levar em consideração que a composição da comunidade microbiana ingerida pela minhoca pode influenciar algumas etapas da digestão. Tem-se proposto que a metanogênese realizada no intestino de minhoca precisa de um *start* do substrato. Além disso, a riqueza de alguns compostos também pode influenciar na dinâmica da produção e consumo de H<sub>2</sub>, e as BRSs são dependentes da disponibilidade de sulfato fazendo com que a dieta seja um fator chave.

Os dados encontrados pela abordagem metagenômica pode não responder todas as perguntas sobre a mineralização da matéria orgânica no intestino de minhoca, mas pode ajudar no desenho de experimentos futuros para avaliar a atividade das bactérias nesse ambiente. Já foram reportadas em minhocas a metanogênese e desnitrificação, mas essas não tiveram seus genes anotados no presente trabalho. Contudo, outras atividades anaeróbicas tiveram seus genes anotados, mostrando que o intestino de minhoca possui genes para os mais diversos processos para a realização da mineralização da matéria orgânica. Vale ressaltar que grande parte dos dados não foi analisada. Grande parte das leituras obtidas do sequenciamento não foi utilizada para a montagem dos *contigs* e grande parte das *ORFs* não teve anotação. Os resultados apresentados aqui representam cerca de 5% de toda a informação obtida do sequenciamento. Uma das possíveis razões para isto é o número de anaeróbicos residentes no intestino. Bactérias anaeróbicas são mais difíceis de caracterizar geneticamente do que bactérias aeróbicas (BROWN *et al*, 2011). Além disso, grande parte dos organismos presentes no intestino das minhocas devem fazer parte das bactérias não cultiváveis, adicionando mais uma dificuldade para a caracterização genética.

Apesar dessas limitações, foi possível verificar o grande potencial metabólico das regiões posteriores de ambas as espécies de minhoca. Essa região possui genes para a maioria das vias de fermentação mesmo sendo uma região com menor riqueza de carbono quando comparada com as regiões anterior e média. O próximo passo seria pesquisar se esse potencial é usado. No presente trabalho foi utilizada a abordagem metatranscriptômica para verificar esse potencial. Os dados de *P. excavatus* mostram apenas a via do succinato sendo transcrita. Todavia a profundidade do sequenciamento do

metatranscriptoma pode ter sido uma das razões de outras vias fermentativas não terem sido anotadas.

A dificuldade na anotação de grande parte das sequências não é uma dificuldade isolada do presente trabalho (RADAX *et al.*, 2012; XIONG *et al.*, 2012). Além disso, um trabalho (BROWN *et al.*, 2011) que realizou o metagenoma e o metatranscriptoma conjuntamente e usou o metagenoma como referência para anotação dos *reads* do metatranscriptoma, também se deparou com uma grande dificuldade de *reads* mapeados para *ORFs* não anotadas. Esses dados sugerem que existem muitos genes que estão sendo transcritos para os quais não se sabe ainda a função, e que provavelmente grande parte das *ORFs* preditas e não anotadas no presente trabalho possuem função, além destes genes possivelmente estarem ativos. Os dados também mostram que são necessários avanços na caracterização de genes, e assim nos bancos de dados de referência.

A profundidade no sequenciamento está relacionada com o grau de cobertura, e pode melhorar a quantidade de informação para a montagem dos *contigs*. Maior número de *contigs* e *contigs* maiores aumenta a informação contida nos *reads*. No entanto, os algoritmos utilizados na montagem de sequências curtas como os *reads* provenientes da plataforma Ion Torrent e também do Illumina, não tem sido otimizados. A questão sobre a profundidade ideal no sequenciamento, para se obter dados suficientes para determinar o perfil metabólico da comunidade microbiana, está ainda em discussão, e é importante ter em mente que cada ambiente pode necessitar de uma qualidade diferente de sequenciamento, já que a qualidade está atrelada a diversidade em determinado ambiente, assim como o tamanho dos genomas presentes nessas comunidades.

Apesar do baixo número de genes anotados, o presente trabalho mostrou que a abordagem do metatranscriptoma tem potencial de revelar quais genes estão sendo expressos na comunidade bacteriana do intestino de minhoca. Além disso, os dados mostram que a união dos dados de metatranscriptoma, metagenoma e 16S rDNA ajuda na caracterização mais completa da comunidade microbiana. Outras estratégias como proteoma e metaboloma devem agregar informações nessa caracterização. No futuro, o entendimento da organização e inter-relações deve vir da união de dados de diversas abordagens. Esses estudos requerem investimentos, e estudos pilotos como os apresentados aqui podem ajudar na sua viabilidade.



## 6 CONCLUSÕES

- Diferentes métodos foram testados para a extração e purificação de DNA das amostras do intestino das minhocas. Dos métodos comerciais avaliados, o método M1 (Power Soil Kit da Mo Bio) teve sucesso na amplificação do gene 16S rRNA para todas as regiões do intestino e pode ser usado em projetos que tenham como objetivo a análise de biodiversidade bacteriana através do gene 16S rRNA.
- Dos métodos de extração de DNA manual apenas os métodos M3 e M7 tiveram êxito na amplificação do gene 16S rRNA para todas as regiões do intestino da minhoca, portanto ambos os métodos podem ser usados em estudos que possuam o objetivo de estudar a biodiversidade bacteriana através do gene 16S rRNA. No entanto, para estudos de prospecção *in silico* e clonagem para expressão de proteínas recomenda-se apenas o método M7 uma vez que foi o único que teve sucesso para a extração de DNA de alta massa molecular.
- Os resultados apresentados indicam que a passagem do substrato através do intestino de *P. excavatus* e *D. annae* modifica a estrutura da comunidade microbiana, revelando a existência de uma influência do intestino dessas espécies de minhoca sobre a microbiota do material ingerido. Além disso, a mudança na estrutura da comunidade bacteriana é dependente da espécie de minhoca.
- Há evidência de uma microflora vinculada ao intestino de minhoca, sendo que os filos TM6 e Verrumicrobia são fortes candidatos a terem bactérias que desenvolveram um mutualismo (talvez em nível de simbiose) com as minhocas.
- Os dados do metagenoma e do metatranscriptoma mostraram genes para o metabolismo central como DNA, RNA, metabolismo de proteínas e energia.
- Os dados do metagenoma mostram que toda a região do intestino possui potencial para a digestão da matéria orgânica embora os dados indiquem diferentes níveis de digestão nas diferentes regiões
- Os dados do metagenoma indicam a existência de um potencial genético para diversas vias relacionadas à fermentação da matéria orgânica.

## 7 REFERÊNCIAS

AGRIC, K. J. Standardization of method for genomic DNA extraction in earthworms Plate 1 . A view of adult earthworm *Eudrilus eugeniae* used for genomic DNA extraction studies Agarose gel electrophoresis showing DNA of earthworm obtained from various parts of the body. **Journal Agriculture Science** v. 22, n. 4, p. 918–921, 2009.

AIRA, M.; MONROY, F.; DOMÍNGUEZ, J. Changes in microbial biomass and microbial activity of pig slurry after the transit through the gut of the earthworm *Eudrilus eugeniae* (Kinberg, 1867). **Biology Fertility Soil**. v. 42. p 371–376, 2006.

AIRA, M.; DOMÍNGUEZ, J. Earthworm Effects without Earthworms: Inoculation of Raw Organic Matter with Worm-Worked Substrates Alters Microbial Community Functioning. **Public Library of Science ONE**. v. 6. p, 2011.

AIRA, M; BYBEE, S; PÉREZ-LOSADA, M; DOMÍNGUEZ, J. Feeding on microbiome: effects of detritivory on the taxonomic and phylogenetic bacteria composition of animal manure. **Microbiology Ecology**. v. 91. p. 1-10, 2015.

AIRA, M.; OLCINA, J.; PÉREZ-LOSADA, M.; DOMÍNGUEZ, J. Characterization of the bacterial communities of casts from *Eisenia andrei* fed with different substrates. **Applied Soil Ecology**. V. 98. P 103-111, 2016.

AZEVEDO, M. O. e organizadores. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003.

BOGA, H. I.; BRUNE, A. Hydrogen-Dependent Oxygen Reduction by Homoacetogenic Bacteria Isolated from Termite Guts. **Applied and Environmental Microbiology**. 69, n. 2, p. 779–786, 2003.

BALDERSTON, W. L.; PAYNE, W. J. Inhibition of Methanogenesis in Salt Marsh Sediments and Whole-Cell Suspensions of Methanogenic Bacteria by Nitrogen Oxides. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 32. p. 264-269, 1976.

BAROIS, I., B. VERDIER, P. KAISER, P. LAVELLE, A. MARIOTTI Y P. RANGEL. Influence of the tropical earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae) on the fixation and mineralization of nitrogen. In. Bonvicini Pagliai A. M. y P. Omodeo (eds). **On Earthworms**. p. 151-158. Mucchi, Modena, Italy, 1987.

BAROIS I, BROSSARD M, LAVELLE P, TONDOH J, KANYONYO J, MARTÍNEZ A, ROSSE, J. P.; SENAPATI, B. K.; ANGELES, A.; FRAGOSO, C.; JIMENEZ, J. J.; DECAËNS, T.; LATTAUD, C.; KANYONY, J.; BLANCHARD, E.; CHAPUIS, L.; BROWN, G.; MORENO, A. Ecology of earthworm species with large environmental tolerance and/or extended distributions. In: LAVELLE P, HENDRIX P, BRUSSARD L (eds). **Earthworm management in tropical agroecosystems**. CAB International: London, p 57-86, 1999.

BERGMANN, G. T.; BATES, S.T.; EILERS, K. G.; CHRISTIAN L. LAUBER, C. L.; CAPORASO, J. G.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. The under-

recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 43. p 1450-1455, 2011.

BORM, S. V.; BUSCHINGER, A.; BOOMSMA, J. J.; BILLEN, J. Tetraponera ants have gut symbionts related to nitrogen-fixation root-nodule bacteria. **The royal society**. v. 269. p. 2023-2027, 2002.

BRADLEY, R. L.; NÁKOVÁ, A. C.; ELHOTTOVÁ, D.; SIMEK, M. Interactions between land-use history and earthworms control gross rates of soil methane production in an overwintering pasture. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 53. p. 64-71, 2012.

BRAUMAN, A.; MAJEED, M. Z.; BUATOIS, B.; ROBERT, A. Nitrous Oxide (  $N_2O$  ) Emissions by Termites : Does the Feeding Guild Matter ?. **PLoS ONE**. p. 1–13, 2015.

BRENNER DJ, FARMER JJ. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. (2 ed). New York. Springer, 2005.

BROWN, C. T.; AUSTIN G. RICHARDSON, D.; GIONGO, A.; GANO, K. A.; CRABB, D. B.; MUKHERJEE, N.; CASELLA, G.; DREW, J. C.; ILONEN, J.; KNIP, M.; HYÖTY, H.; VEIJOLA, R.; SIMELL, T.; SIMELL, O.; NEU, J.; WASSERFALL, C. H.; SCHATZ, D.; ATKINSON, M. A.; TRIPLETT, E. W. Gut Microbiome Metagenomics Analysis Suggests a Functional Model for the Development of Autoimmunity for Type 1 Diabetes. **PloS ONE**. v. 6, 2011.

BYZOV, B. A.; KHOMYAKOV, N. V.; KHARIN, S. A.; KURAKOV, A. V. Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms. **European Journal of Soil Biology**, v. 43, p 149-156, 2007.

BOLLAG, J. M. CZLONKOWSKI, S. T. Inhibition of methane formation in soil for various nitrogen-containing compounds. **Soil Biology Biochemistry**. v. 5. p. 673-678, 1973.

CASTELLE, C. J.; HUG, L. A.; WRIGHTON, K. C.; THOMAS, B. C.; WILLIAMS, K. H.; WU, D.; TRINGE, S. G.; SINGER, S. W.; EISEN, J. A.; BANFIELD, J. F. Extraordinary phylogenetic diversity and metabolic versatility in aquifer sediment. **Nature communications**. v. 4, p. 1–10, 2013.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; DAN KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; PETER J TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W. A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; JESSE ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**. v. 7. p 335-336, 2010.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns

of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 108. p 4516-4522, 2011.

CHU, C; LI, Y; XU, K; E, Y; I, Y; K, H. A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. **International Journal of Hydrogen energy**. v. 33. p. 4739-4746, 2008.

DAVIDSON, S. K.; POWELL R. J.; STAHL, D. A. Transmission of a bacterial consortium in *Eisenia fetida* egg capsules. **Environmental Microbiology**. v. 12. p 2277-2288, 2010.

DENMAN, S. E.; FERNANDEZ, G. M.; SHINKAI, T.; MITSUMORI, M.; FORSTER, R. J. Metagenomic analysis of the rumen microbial community following inhibition of methane formation by a halogenated methane analog. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, n. October, p. 1–12, 2015.

DEPKAT-JAKOB, P. S.; HILGARTH, M.; HORN, M. H.; DRAKE, H. L. Effect of Earthworm Feeding Guilds on Ingested Dissimilatory Nitrate Reducers and Denitrifiers in the Alimentary Canal of the Earthworm. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76. p. 6205-6214, 2010.

DEPKAT-JAKOB, P. S.; HUNGER, S.; SCHULZ, K.; BROWN, G. G.; TSAI, S. M.; Drake, H. L. Emission of methane by *Eudrilus eugeniae* and other earthworms: From Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 8, p. 3014–3019, 2012.

DEPKAT-JAKOB, P. S.; BROWN, G. G.; TSAI, S. M.; HORN, M. A.; DRAKE, H. L. Emission of nitrous oxide and dinitrogen by diverse earthworm families from Brazil and resolution of associated denitrifying and nitrate-dissimilating taxa. **Federation of European Microbiological Societies**. v. 83. p. 375-391, 2013.

DEZOTTI, M. **Processos e Técnicas para o Controle Ambiental de Efluentes Líquidos**. Rio de Janeiro: E-papers, 2008.

DRAKE, H. L.; HORN, M. A. As the worm turns: The earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. **Annual Review of Microbiology**. v.61. p 169-89, 2007.

DRAKE, H. L.; SCHRAMM, A.; HORN, M. A. Gut Microbial Biomes : 3 Earthworm Their Importance to Soil Microorganisms , Denitrification , and the Terrestrial Production of the Greenhouse Gas N<sub>2</sub>O The Earthworm Gut as a Transient Microbial Habitat. , v. 6, 2006.

DOWD, S.E.; CALLAWAY, T. R.; WOLCOTT, R. D.; SUN, Y.; TREVOR MCKEEHAN, T.; ROBERT G HAGEVOORT, R. G.; THOMAS S EDRINGTON, T. S. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). **BMC Microbiology**. 2008.

DURSO, L. M.; HARHAY, G. P.; SMITH, T. P. L.; JAMES L. BONO, J. L.; TODD Z. DESANTIS, T. Z.; HARHAY, D. M.; ANDERSEN, G. L.; KEEN, J. E.; LAEGREID,

W. W.; CLAWSON; M. L. Animal-to-Animal Variation in Fecal Microbial Diversity among Beef Cattle. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, p 4858–4862, 2010.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics Applications Note**. v. 26. P 2460-2461, 2010.

EDWARDS, C. A.; DOMINGUEZ, J.; NEUHAUSER, E. F. Growth and reproduction of *Perionyx excavatus* (Perr.) (Megascolecidae) as factors in organic waste management. **Biol Fertil Soils**, p 155-161, 1998.

ELSGAARD, L., D. PRIEUR, MUKWAYA, M. G., JORGENSEN, B. B. Thermophilic sulfate reduction in hydrothermal sediment of lake Tanganyika, East-Africa. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 60, p. 1473-1480, 1994.

FEAZEL, L. M.; BAUMGARTNER, L.K.; PETERSON, K. L.; FRANK, D. N.; HARRIS, J. K.; PACE, N. R. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 106, p 16393–16399, 2009.

FRANZOSA, E. A.; MORGAN, X. C.; SEGATA, N.; WALDRONA, L.; REYESA, J.; EARLB, A. M.; GIANNOUKOSB, G.; BOYLANC, M. R.; CIULLAB, D.; GEVERSB, D.; IZARDD, J.; GARRETTB, W. S.; CHANC, A. T.; HUTTENHOWER, C. Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. p. 2329-2338, 2014.

FURLONG, M. A., D. R. SINGLETON, D. C. COLEMAN, AND W. B. WHITMAN. Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68. p. 1265-1279, 2002.

GIBSON, G. R. Physiology and ecology of the sulfate-reducing bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, n. 6, p. 769-797, 1990.

GIBSON, G. R.; MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Sulphate reducing bacteria and hydrogen metabolism in the human large intestine. **Gut**.v. 34. p. 437-439, 1993.

GIRIJA, D.; DEEPA, K.; XAVIER, F.; ANTONY, I.; SHIDHI, P. R. Analysis of cow dung microbiota – A metagenomic approach. **Indian Journal of Bactechonology**. v. 12. p 372-378, 2013.

GOMEZ-BRANDO, M.; DOM'INGUEZ, J. Recycling of Solid Organic Wastes Through Vermicomposting: Microbial Community Changes Throughout the Process and Use of Vermicompost as a Soil Amendment. **Environmental Science and Technology**. v. 44. p 1289–1312, 2014.

GRAF, D.; DI CAGNO, R.; FAK, F.; FLINT, H. J.; NYMAN, M.; SAARELA, M.; WATZL, B. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. **Microbial Ecology in Health & Disease**. v. 26, 2015.

GRAY, J. P.; HERWIG, R. P. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4049–4059, 1998

GREEN, S. J.; MICHEL JR, F. C.; HADAR, Y.; MINZ, D. Similarity of bacterial communities in sawdust- and straw-amended cow manure composts. **FEMS Microbiology Letters**. v. 233. p 115-123, 2004.

GRIFFITHS, R. I; WHITELEY, A. S; O'DONNELL, A. G; BAILEY, M. J. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA and rRNA-Based Microbial Community Composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5488-5491, 2000.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemica Biologia**., v. 5, n. 10, p.245-249, 1998.

HARDISON, A. K.; ALGAR, C. K.; GIBLIN, A. E.; RICH, J. J. Influence of organic carbon and nitrate loading on partitioning between dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) and N<sub>2</sub> production. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. v. 164. p. 146–160, 2015.

HENNE, K.; KAHLISCH, L.; BRETTAR, I.; HÖFLE, M. G. Analysis of Structure and Composition of Bacterial Core Communities in Mature Drinking Water Biofilms and Bulk Water of a Citywide Network in Germany. **Applied and Environmental Microbiology**. p 3530-3538, 2012.

IHSSEN, J; HORN. M. A; MATTHIES, C; GÖBNER, A; SCHRAMM, A. N<sub>2</sub>O-producing microorganism in the gut in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* are indicative of ingested soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 1655-1661, 2003.

HONGO, Y.; OHKUMA, M.; KUDO, T. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). **FEMS Microbiology Ecology**. v.44. p 231-242, 2003.

HORN, M.A.; SCHRAMM, A.; DRAKE, H. L. The Earthworm Gut: an Ideal Habitat for Ingested N<sub>2</sub>O-Producing Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1662-1669, 2003.

HORN, M. A.; IHSSEN, J.; MATTHIES, C.; Schramm, A.; Acker, G.; Drake, H. L.. *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericanus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N<sub>2</sub>O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1255–1265, 2005.

HOWE, H. Constraints on the evolution of mutualisms. **The American Naturalist**. v. 123. p 764-777, 1984.

IDOWU, A.B.; EDEMA M.O.; ADEYI, A.O. Distribution of bacteria and fungi in the earthworm *Libyodrilus violaceus* (Annelida: Oligochaeta), a native earthworm from Nigeria. **Revista de Biologia Tropical**, v. 54, p 49-58, 2006.

ISKEN, S.; DE BONT, J. A. M. Bacteria tolerant to organic solvents. **Extremophiles**. v.2, n. 3, p. 229–238, 1998.

JAMES, S.; GUIMARÃES, A. Discovery and Development of New Species for Vermiculture. In. EDWARDS, C. A.; ARANCON, N. Q.; SHERMAN, R. L. **Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management**. CRC Press, 2010. Cap. 4.

JAYASINGHE, D.; PARKINSON, D. Earthworms as the vectors of actinomycetes antagonistic to litter decomposer fungi. **Applied Soil Ecology**, v. 43, p 1-10, 2009.

JEANTHON, C., S. L'HARIDON, CUEFF, V., BANTA, A., REYSENBACH, A. L., PRIEUR, D. Thermodesulfobacterium hydrogenophilum sp nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus Thermodesulfobacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 52, p. 765-772, 2002.

JIMÉNEZ, J. M.; ZÚÑIGA, G.; TANACA, V. L. RODRÍGUEZ, C. H. Bacterial community and nitrogen fixation in red turpentine beetle, *Dentroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Microbiology ecology**. v. 58. p. 879-891, 2009.

JOVEL, J.; PATTERSON, J.; WANG, W.; HOTTE, N.; KEEFE, S. O.; MITCHELL, T.; PERRY, T.; KAO, D.; MASON, A. L.; MADSEN, K. L.; K.-S.WONG, K. S. Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, n. April, p. 1–17, 2016.

KUHNIGK, T.; BRANKE, J.; KREKELER, D.; CYPIONKA, H.; KONIG, H. A Feasible Role of Sulfate-Reducing Bacteria in the Termite Gut. **Applied Microbiology**. v. 149, p. 139–149, 1996.

LATTAUD, C.; ZHANG, B. G.; LOCATI, S.; ROULAND, C.; LAVELLE, P. Activities of the digestive enzymes in the gut and in tissue culture of a tropical geophagous earthworm, *polypheretima elongata* (megascolecidae). **Soil Biology and Biochemistry**. v. 29, p 335-339, 1997a.

LATTAUD, C.; LOCATI, S.; MORA, P.; ROULAND, C. Origin and activities of glycolytic enzymes in the gut of the tropical geophagous earthworm *Millsonia anomala* from Lamto (Côte d'Ivoire). **Pedobiologia**. v. 41. p 242-251, 1997b.

LATTAUD, C.; MORA, P.; GARVÍN, M.; LOCATI, S.; ROULAND, C. Enzymatic digestive capabilities in geophagous earthworms - origin and activities of cellulolytic enzymes. **Pedobiologia**. v. 43. p 842-850, 1999.

LAVELLE, P.; LATTAUD, C.; TRIGO, D.; BAROIS, I. Mutualism and biodiversity in soil. **Plant and Soil**. v. 170. p 23-33, 1995.

LAVELLE, P.; BIGNELL, D.; LEPAGE, M.; et al.. Soil function in a changing world : the role of invertebrate ecosystem engineers. **European Journal of Soil Biology**, v. 33, n. May 1996, p. 159–193, 1997.

LEADBETTER, J. R.; BREZNAK, J. A. Physiological Ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., Isolated from the Hindgut of the Termite *Reticulitermes flavipes*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3620–3631, 1996.

LEAHY, S. C.; KELLY, W. J.; ALTERMANN, E.; RONIMUS, R. S.; YEOMAN, C. J.; PACHECO, D. M.; LI, D.; KONG, Z.; MCTAVISH, S.; SANG, C.; LAMBIE, S. C.; JANSSEN, P. H.; DEY, D. The Genome Sequence of the Rumen Methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* Reveals New Possibilities for Controlling Ruminant Methane Emissions. **PloS ONE**. v. 5, n. 1, 2010.

LEAR, G.; NIYOGI, D.; HARDING, J.; DONG, Y.; LEWIS, G. Biofilm Bacterial Community Structure in Streams Affected by Acid Mine Drainage. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, p 3455–3460, 2009.

LEY, R. E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P.; RAMEY, R. R.; BIRCHER, J. S.; SCHLEGEL, M. L.; TUCKER, T. A.; SCHRENZEL, M. D.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**. v. 320. p 1647-1651, 2008.

LOMBARD, N.; PRESTAT, E.; VAN ELSAS, J. D.; SIMONET, P. Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, n. 1, p. 31–49, 2011.

LOPEZ, S.; MCINTOSH, F. M.; WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C. J. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. **Animal Feed Science and Technology**. v. 78, p. 1–9, 1999.

LOZUPONE C, KNIGHT R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied Environment Microbiol**. v. 71. p 8228–8235, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de BROCK**. (12 ed). Porto Alegre. Artmed, 2010.

MAIA, M.S.; BRUMER, B.B.; NOVAES, R.M.L.; SILVA, D.C.G.; KUWAHARA, M.K.; DALCIN, M.B.1; MARCELINO-GUIMARAES, F.C; ABDELNOOR, R.V. **Método de extração de DNA de folhas de soja adaptado para larga escala**. VIII Jornada Acadêmica da Embrapa Soja. 2013

MANDAL, R. S. Metagenomic Surveys of Gut Microbiota. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 13, n. 3, p. 148–158, 2015.



MARTIN, D., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K. H., STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes** - A Handbook on the Biology of Bacteria. Springer. ed. 3, v. 2, p. 1156, 2006.

MAURICE CF, HAISER HJ, TURNBAUGH PJ. Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. **Cell**. v.152(1-2). p.39–50, 2013.

MBA CC. (1988). Biomass and vermicompost production by the earthworm *Eudrilus eugeniae* (Kinberg). **Rev Biol Trop**.37: 11–13, 1988.

MCDONALD, D.; CLEMENTE, J. C.; KUCZYNSKI, J.; RIDEOUT, J. R.; STOMBAUGH, J.; WENDEL, D.; WILKE, A.; HUSE, S.; HUFNAGLE, J.; MEYER, F.; KNIGHT, R.; CAPORASO, G. J. The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. **GigaScience**. p 1-6, 2012.

MCGARVEY, J.A.; MILLER, W.G.; SANCHEZ, S.; STANKER, L. Identification of Bacterial Populations in Dairy Wastewaters by Use of 16S rRNA Gene Sequences and Other Genetic Markers . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p 4267–4275, 2004.

MCLEAN, J. S.; LOMBARDO, M. J.; BADGER, J. H.; ANNA EDLUND, A.; NOVOTNY, M.; YEE-GREENBAUM, J.; VYAHIC, N.; HALL, A. P.; YANG, Y.; DUPONT, C. L.; ZIEGLER, M. G.; CHITSAZ, H.; ALLEN, A. E.; YOOSEPH, S.; TESLER, G.; PEVZNER, P. A.; FRIEDMAN, R. M.; KENNETH H. NEALSON, K. H.; VENTER, J. C.; LASKEN, R. S. Candidate phylum TM6 genome recovered from a hospital sink biofilm provides genomic insights into this uncultivated phylum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. p 2390-2399, 2013.

MCNULTY NP, YATSUNENKO,T.; HSIAO1, A.; FAITH, J. J.; MUEGGE, B. D.; GOODMAN, A. L.; HENRISSAT, B.; OOZEER, R.; COOLS-PORTIER, S.; GOBERT, G.; CHERVAUX, C.; KNIGHTS, D.; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R.; DUNCAN, A. E.; BAIN, J. R.; MUEHLBAUER, M. J.; NEWGARD, C. B.; HEATH, A. C.; GORDON, J. I. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. **Science Transl Medicine**. 2011.

MEJÍA-LEÓN, M. E.; CALDERÓN, A. M.; BARCA, D. Diet , Microbiota and Immune System in Type 1 Diabetes Development and Evolution. **Nutrients**. p. 9171–9184, 2015.

MEN, Y.; YU, K.; BÆLUM, J.; GAO, Y.; TREMBLAY, J.; PRESTAT, E.; STENUIT, B.; TRINGE, S. G.; JANSSON, J.; ZHANG, T.; ALVAREZ-COHEN, L. Metagenomic and Metatranscriptomic Analyses Reveal the Structure and Dynamics of a Dechlorinating Community Containing *Dehalococcoides mccartyi* and Corrinoid-Providing Microorganisms under Cobalamin-Limited Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 83. p. 3508-3516, 2017.

MOIR, J. W. B. **Nitrogen Cycling in Bacteria: Molecular Analysis**. Norfolk, UK. Horizon Scientific Press, 2011.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B.A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nat. Methods** v. 5, p. 621-628, 2008.

MÜLLER, V. Energy conservation in acetogenic bacteria. **Applied and environmental microbiology**. p. 6345-6353, 2003.

MUNNOLI, P. M.; SILVA, J. A. T.; BHOSLE, S. Dynamics of the Soil-Earthworms-Plant Relationship: a review. **Dynamics Soil, Dynamics Plant Global Science books**, v.4, p 1-21, 2010.

NAKAJIMA, H.; HONGO, Y.; USAMI, R.; KUDO, T.; OHKUMA, M. Spatial distribution of bacterial phylotypes in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* and the bacterial community colonizing the gut epithelium. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 54. p 247–255, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. (4 ed). São Paulo: Sarvier, 2006.

NGUGI, D. K.; BRUNE, A. Nitrate reduction , nitrous oxide formation , and anaerobic ammonia oxidation to nitrite in the gut of soil-feeding termites (*Cubitermes* and *Ophiotermes* spp.). **Environmental Microbiology** v. 14, p. 860–871, 2012.

NODA, S.; OHKUMA, M.; USAMI, R.; HORIKOSHI, K.; KUDO, T. Culture-Independent Characterization of a Gene Responsible for Nitrogen Fixation in the Symbiotic Microbial Community in the Gut of the Termite *Neotermes koshunensis*. **Applied and environmental microbiology**. p. 4935-4942, 1999.

OLEYNIK, A. S.; BYZOV, B. A. Response of Bacteria to Earthworm Surface Excreta. **Microbiology**, v.77, p. 765-773, 2008.

OULAS, A.; PAVLOUDI, C.; POLYMENAKOU, P.; et al.. Metagenomics : Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. **Libertas academica**. , p. 75–88, 2015.

OWA, S. O.; OLOWOPARIJA, S. B.; ALADESIDA, A.; DEDEKE, G. A. Enteric bacteria and fungi of the Eudrilid earthworm *Libyodrilus violaceus*. **African Journal of Agricultural**. V. 8. P 1760-1766, 2011.

OWA, S. O.; OLOWOPARIJA, S. B.; ALADESIDA, A.; DEDEKE, G. A. Enteric bacteria and fungi of the Eudrilid earthworm *Libyodrilus violaceus*. **African Journal of Agricultural Research**. v. 8, p 1760-1766, 2013.

PASS, D. A; MORGAN, A. J; READ; D. S; FIELD, D; WEIGHTMAN, A. J; KILLE, P. The effect anthropogenic arsenic contamination on the earthworm microbiome. **Environemntal Microbiology**. v. 17. p. 1884-1896, 2015.

PARTHASARATHI, K.; RANGANATHAN, L. S.; ANANDI, V.; ZEYER, J. Diversity of microflora in the gut and casts of tropical composting earthworms reared on different substrates. **Journal of Environmental Biology**. v. p 87-97, 2007.

PEDERSON, J. C.; HENDRIKSEN, N. B. Effect of passage through the intestinal tract of detritivore earthworms (*Lumbricus* spp.) on the number of selected Gram-negative and total bacteria. **Biology Fertility Soil**. v. 16. p 227-232, 1993.

PICARD, C.; PONSONNET, C.; PAGET, E.; NESME, X.; SIMONET, P. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2717–2722, 1992.

POSTGATE, J. R.; KENT, H. M.; ROBSON, R. L.; CHESHYRE, J. A. The genomes of *Desulfovibrio gigas* and *Desulfovibrio vulgaris*. *Journal of General Microbiology*, v. 130, p. 1597-1601, 1984.

POULIN, P.; PELLETIER, E. & SAINT-LOUIS, R. Seasonal variability of denitrification efficiency in northern salt marshes: An example from the St. Lawrence Estuary. **Marine Environmental Research**. 63: 490-505, 2007.

PRABHA, M. L.; JAYARAJ, I. A.; JEYARAJ, R.; RAO, S. Comparative studies on the digestive enzymes in the gut of earthworms, *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia fetida*. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p 567-569, 2007.

RADAX, R.; RATTEL, T.; LANZEN, A.; BAYER, C.; RAPP, H. T.; URICH, T.; SCHLEPER, C. Metatranscriptomics of the marine sponge *Geodia barretti*: Tackling phylogeny and function of its microbial community. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 1308–1324, 2012.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p. 576–590, 2008.

REINECKE, A. J.; HALLATT, L. Growth and cocoon production of *Perionyx excavatus* (Oligochaeta). **Biology and Fertility of Soils**, v. 8, n. 4, p. 303–306, 1989.

RHEIMS, H.; RAINEY, F. A.; STACKEBRANDT, E. A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. **Journal of industrial microbiology**. v. 17. P 159-169, 1996.

ROBE, P.; NALIN, R.; CAPELLANO, C.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P. Extraction of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 39, n. 4, p. 183–190, 2003.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de Plantas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. v. 2. p. 40-43, 1999.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados : uma abordagem funcional-evolutiva** . (7 ed). São Paulo: Roca, 2005.

SAGAR, K.; SINGH, S. P.; GOUTAM, K. K.; KONWAR, B. K. Assessment of five soil DNA extraction methods and a rapid laboratory-developed method for quality soil DNA extraction for 16S rDNA-based amplification and library construction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 97, n. 1, p. 68–73, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. (2 ed.). New York: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMUEL, B. S.; HANSEN, E. E.; MANCHESTER, J. K.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; FULTON, R.; LATREILLE, P.; KIM, K.; WILSON, R. K.; GORDON, J. I. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. **PNAS**. v. 104, n. 25, 2007.

SCHMIDT, O. **Hydrogen Metabolizers: Drivers of Anaerobic Degradation Processes in Peatlands and Earthworm Guts**. Doctoral thesis. Faculty of Biology, Chemistry, and Geosciences of the University of Bayreuth, 2016.

SCHULZ K, HUNGER S, BROWN GC, TSAI SM, CERRI CC, CONRAD R, DRAKE HL. Methanogenic food web in the gut contents of methane-emitting earthworm *Eudrilus eugeniae* from Brazil. **ISME J**. 9: 1778-1792, 2015.

SEGURA, A.; MOLINA, L.; FILLET, S.; Krell, T.; Bernal, P.; Muñoz-Rojas, J.; Ramos, J. L. Solvent tolerance in Gram-negative bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 415–421, 2012.

SERKEBAEVA, Y. M.; KIM, Y.; LIESACK, W.; DEDYSH, S. N. Pyrosequencing-Based Assessment of the Bacteria Diversity in Surface and Subsurface Peat Layers of a Northern Wetland, with Focus on Poorly Studied Phyla and Candidate Divisions. **PLoS ONE**. v 8, 2013.

SHANKAR, T.; MARIAPPAN. V.; ISAIARASU, L. Screening Cellulolytic Bacteria from the Mid-Gut of the Popular Composting Earthworm, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg). **World Journal of Zoology**, v. 6, p 142-148, 2011.

SHANNON, P., MARKIEL, A., OZIER, O., BALIGA, N. S., WANG, J. T., RAMAGE, D., AMIN, A.; ACHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**. v.13. p 2498–2504, 2003.

SHARPTON, T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. June, p. 1–14, 2014.

SHWETA, M. Cellulolysis: A transient property of earthworms or symbiotic/ingested microorganisms? **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 2, p 1-8, 2012.

SILVA, S.Q. (2004). **Activity and diversity of sulphate-reducing bacteria and methanogenic archaea in contrasting sediments from the River Colne estuary**. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy, department of Biological Sciences, University of Essex, London.

SINGH, A.; SINGH, P. D.; TIWARI, R.; KUMAR, K.; SINGH, R. V.; SINGH, S.; PRASANNA, R.; SAXENA, A. K.; NAIN, L. Taxonomic and functional annotation of gut bacterial communities of *Eisenia foetida* and *Perionyx excavatus*. **Microbiological Research**, v.175, p.48–56, 2015.

SINHA, R. K.; HERAT, S.; AGARWAL, S.; RAVI ASADI, R.; CARRETERO, E. Vermiculture and waste management: study of action of earthworms *Elsinia foetida*, *Eudrilus euginae* and *Perionyx excavates* on biodegradation of some community wastes in India and Australia. **The Environmentalist**, v. 22, p 261-268, 2002.

SOUZA, V. F.; SANTORO, A. L.; WEERELT, M. VAN; ENRICH-PRAST, A. SEDIMENT DENITRIFICATION, DNRA AND ANAMMOX RATES IN TROPICAL FLOODPLAIN LAKE ( PANTANAL, BRAZIL ). **Oecologia Australis**. v. 16, n. 4, p. 734–744, 2012.

STAUFFER, S. H.; BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; MARR, H.; GOOKIN, J. L. Evaluation of Four DNA Extraction Methods for the Detection of *Tritrichomonas Foetus* in Feline Stool Specimens by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 5, p. 639–641, 2008.

STEFFEN, M. M.; LI, Z.; EFFLER, T. C.; HAUSER, L. J.; BOYER, G. L.; WILHELM, S. W. Comparative Metagenomics of Toxic Freshwater Cyanobacteria Bloom Communities on Two Continents. **PLoS ONE**. V. 7, 2012.

TAN, S. C.; YIAP, B. C. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, 2009.

THAKURIA, D.; SCHMIDT, O.; FINAN, D.; EGAN, D.; DOOHAN, F. M. Gut wall bacteria of earthworms: a natural selection Process. **The ISME Journal**, v. 4, p 357-366, 2010.

TATUSOV, R. L; NATALE, D. A; GARKAVTSEV, I. V; TATUSOVA, T. A; SHANKAVARAM, U. T; RAO, B. S; KIRYUTIN, B; GALPERIN, M. Y; FEDOROVA, N. D; KOONIN, E. V. The COG database: new developments ins phylogenetic classification of proteins from complete genome. **Nucleic Acids Research**. v. 29. p. 22-28, 2001.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, n. 1, p. 3, 2012.

TIEDJE, J. M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to Ammonium. In. ZEHNDER, A. J. B. **Environmental Microbiology of Anaerobes**. New York. John Wiley and Sons.1988.

TIKHOMIROV, V. V. **Hydrogeochemistry fundamentals and advances, mas transfer and mass transport**. John Wiley & Sons. 2016.

TORSVIK, V.; ØVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics and controlling factors. **Science**, v. 296, p. 1064-1066, 2002.

TRIGO, D.; LAVELLE, P. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of soil during gut transit through *Allolobophora mollerì* (Lumbricidae, Oligochaeta). **Biology and Fertility of soils**. v. 15. p 185-188, 1993.

VANDEKERCKHOVE, T. T. M.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; COOMANS, A. Occurrence of novel verrucomicrobial species, endosymbiotic and associated with parthenogenesis in *Xiphinema americanum* group species (Nematoda, Longidoridae). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v 50. p 2197-2205, 2000.

WEISING K, NYBOM H, WOLFF K, MEYER W. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. (1 ed). CRC Press, Boca Raton. 1995.

WINFREY, M. R.; ZEIKUS, J. G. Effect of Sulfate on Carbon and Electron Flow During Microbial Methanogenesis in Freshwater Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 33, n. 2, p. 275–281, 1977.

WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. Spliceosome Structure and Function. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2011.

WU, C. H; AP APWEILER, R; BAIROCH, A; NATALE, D. A; BARKER, W. C; BOECKMANN, B; FERRO, S; GASTEIGER, E; HUANG, H; LOPEZ, R; MAGRANE, M; MARTIN, M. J; MAZUMDER, R; DONOVAN, C. O. REDASCHI, N; SUZEK, B. The Universal Protein Resource (UniProt): na expanding universe of protein information. **Nucleic Acids Research**. v 34. p. 187-191, 2006.

WÜST, P. K.; HORN, M. A.; DRAKE, H. L. In situ hydrogen and nitrous oxide as indicators of concomitant fermentation and denitrification in the alimentary canal of the earthworm *Lumbricus terrestris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 1852–1859, 2009.

WÜST, P. K.; HORN, M. A.; DRAKE, H. L. Clostridiaceae and Enterobacteriaceae as active fermenters in earthworm gut content. **International Society for Microbial Ecology**. v. 5. p 92-106, 2011.

XIONG, X.; FRANK, D. N.; ROBERTSON, C. E.; Hung, S. S.; Markle, J.; Canty, A. J.; McCoy, K. D.; Macpherson, A. J.; Poussier, P.; Danska, J. S.; Parkinson, J. Generation and analysis of a mouse intestinal metatranscriptome through Illumina based RNA-sequencing. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

YANG, C.; GUAN, L.; LIU, J.; WANG, J. Rumen fermentation and acetogen population changes in response to an exogenous acetogen TWA4 strain and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product . **Journal of Zhejiang University-SCIENCE**. v. 16, n. 8, p. 709–719, 2015.

YOON, J. Phylogenetic studies on the bacterial “Verrucomicrobia”. **Microbiology and Culture Collections**. v. 27. p 61-65, 2011.

Young, J. P. W., H. L. Downer, B. D. Eardly. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal Bacteriology**. v.173. p. 2271–2277, 1991.

ZHANG, B. G.; ROULAND, C.; LATTAUD, C.; LAVELLE, P. Activity and origin of digestive enzymes in gut of the tropical earthworm *Pontoscolex corethrurus*. **European Journal of Soil Biology**, v. 29, n. 1, p. 7–11, 1993.

ZEIKUS, J. G. The Biology of Methanogenic Bacteria. **Bacteriological Reviews**. p. 514-541, 1977.

ZHOU, J.; BRUNS, M. A. N. N.; TIEDJE, J. M. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition Downloaded from <http://aem.asm.org/> on January 12 , 2016 by KOREA RES INST OF BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY. , v. 62, n. 2, p. 316–322, 1996.